

На правах рукописи

ШАРЛАИМОВА
Наталья Сергеевна

**КЛЕТКИ ЦЕЛОМИЧЕСКОГО ЭПИТЕЛИЯ
МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS L.*,
ОБЛАДАЮЩИЕ СВОЙСТВАМИ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

03.03.04. – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2011 г.

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Петухова Ольга Александровна
Институт цитологии РАН

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Подгорная Ольга Игоревна
Институт цитологии РАН

кандидат биологических наук
Шапошникова Татьяна Григорьевна
Санкт-Петербургский
государственный университет

Ведущая организация:

Институт биологии моря
им. А.В. Жирмунского ДВО РАН

Защита диссертации состоится «20» января 2012 года в 13 часов на заседании
Диссертационного совета Д 002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу:
194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4.

Адрес электронной почты Института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru

Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

Факс: 8 (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН
Автореферат разослан «___» декабря 2011 г.

Ученый секретарь Диссертационного совет
кандидат биологических наук



Е.В.Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Иглокожие, древнейшие представители группы Deuterostomia (Вторичноротые), характеризуются повышенной способностью к восстановлению утраченных частей тела и являются излюбленным объектом для изучения механизмов регенерации. Предполагают, что процесс регенерации является комбинацией двух процессов — эпиморфоза и морфаллаксиса (Morgan, 1901; Короткова, 1997; Moss et al., 1998; Thorndyke et al., 2001; Candia-Carnevali, 2006; Rinkevich, Matranga, 2009). Первый процесс предполагает восстановление утраченных тканей и органов за счет образования бластемы, состоящей из недифференцированных клеток, которые интенсивно делятся в зоне повреждения. Второй механизм заключается в миграции уже дифференцированных, либо малодифференцированных клеток из определенных клеточных депо.

Процесс регенерации предполагает существование в организме стволовых клеток того или иного уровня (плюрипотентных, мультипотентных или унипотентных), присутствующих в циркулирующих жидкостях или тканях в форме клеток-предшественниц, готовых принять участие в репарации или процессе регенерации. Признаками стволовых клеток являются способность к пролиферации и дифференцировке в разнообразные линии клеток. Кроме того, стволовые клетки характеризуются малыми размерами, высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (отношением диаметра ядра к общему диаметру клетки) и отсутствием морфологических признаков цитодифференцировки. Отмечают высокую теломеразную активность, незначительное количество в тканях и связь клеток с микроокружением, а также асимметричное деление. Существует также набор молекулярных маркеров, характеризующих стволовые клетки (Candia-Carnevali, 2006; Rinkevich, Matranga, 2009; Исаева и др., 2009; Isaeva, 2011).

Темпы регенерации являются видоспецифичной характеристикой. Для морской звезды *Asterias rubens* L., характерны достаточно медленные темпы регенерации, однако существует одна тканевая система, способная к быстрому восполнению. Это аналог кроветворной системы позвоночных животных — клетки целомической жидкости (ЦЖ) — целомоциты (ЦЦ). Основная функция ЦЦ — защитная, они принимают участие в уничтожении патогенов, образовании тромба в области повреждения стенки тела, кроме того, им приписывают функции в регенерации утраченных органов. Восполнение клеточной популяции ЦЦ происходит достаточно быстро — в течение 5–6 ч (Vanden Bossche, JanGoux, 1976). Механизмы этого процесса до сих пор не выяснены.

Для *A. rubens* показано, что пролиферативная активность ЦЦ находится на очень низком уровне и на ранних сроках после травмирования не увеличивается, таким образом, по-видимому, восполнение популяции ЦЦ проходит за счет миграции клеток из определенных клеточных депо (Moss et al., 1998). Полагают, что наиболее вероятным источником клеток ЦЖ является целомический эпителий (ЦЭ). С использованием ферритиновой метки было показано, что при нескольких последовательных «кровопусканиях» происходит выход клеток из ЦЭ в целомическую полость (Vanden Bossche, JanGoux, 1976). Кроме того, согласно электронно-микроскопическим данным «зрелые» (дифференцированные) ЦЦ были обнаружены в составе ЦЭ (Cobb, 1978; Schoenmakers et al., 1981; Горшков и др., 2009). Эти данные свидетельствуют в пользу преобладания морфаллаксии

ческих процессов в ходе быстрого восстановления популяции ЦЦ за счет миграции уже дифференцированных клеток из состава ЦЭ в целомическую полость.

Из литературных источников известно, что изменений состава клеточной популяции ЦЦ в ответ на травмирование не выявлено (Vanden Bossche, JanGoux, 1976; Pinsino et al., 2007). Однако, в предыдущей работе, проведенной в нашей группе, было показано, что при определенном «тяжелом», травмировании, когда полость тела животных дополнительно промывается морской водой, происходит изменение клеточного состава популяции ЦЦ за счет увеличения доли малых клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (Козлова и др., 2006). Этот факт позволяет предположить, что восполнение популяции ЦЦ может происходить не только за счет «зрелых», но и за счет малых клеток. Существуют также данные, что на ранних сроках регенерации у *A. rubens* пролиферативной активностью обладают клетки ЦЭ с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (Moss et al., 1998).

Цели и задачи исследования

Целью работы является морфофункциональная характеристика малых клеток ЦЖ и ЦЭ. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследование пролиферативной активности клеток ЦЖ и ЦЭ с помощью анализа включения аналога тимидина — бромодезоксиуридина, а также после окраски антителами (АТ) на H3-фосфогистон, являющегося маркером митотических клеток. Анализ суспензий клеток ЦЖ и ЦЭ методом проточной цитофлуориметрии.

2. Гистологический анализ суспензий клеток ЦЖ и ЦЭ после окраски азур-эозином, определение доли малых клеток в составе популяций; динамика клеточного состава в ответ на травмирование.

3. Определение локализации малых клеток в составе ЦЭ, оценка способности к миграции из состава ЦЭ.

4. Исследование возможности культивирования клеток ЦЖ и ЦЭ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Пролиферативной активностью в составе ЦЖ и ЦЭ обладают малые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением — малые эпителиоциты (ЭЦ).

2. Малые ЭЦ выявлены как в составе популяции клеток ЦЖ, так и в составе популяции клеток ЦЭ, причем обнаружена новая субпопуляция клеток ЦЭ, обогащенная этим типом клеток. Малые ЭЦ способны выходить из состава ЦЭ в целомическую полость.

3. Малые ЭЦ при культивировании сохраняют пролиферативную активность в течение длительного времени.

4. Малые ЭЦ обладают избирательным сродством к ламинину, белку внеклеточного матрикса.

5. При культивировании клеток ЦЭ на ламинине наблюдается повышенная пролиферативная активность, которая сохраняется в течение длительного времени.

6. Малые клетки целомического эпителия проявляют черты стволовых клеток.

Научная новизна работы

В работе впервые охарактеризован клеточный состав ЦЭ и описаны морфофункциональные свойства малых клеток ЦЖ и ЦЭ. В составе ЦЭ впервые обнаружена новая субпопуляция клеток ЦЭ, обогащенная малыми эпителиальными клетками с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, характе-

ризующимися дискретным распределением хроматина. Часть популяции клеток этого типа обладает пролиферативной активностью, и, кроме того, по данным проточной цитофлуориметрии, часть популяции малых клеток в составе новой субпопуляции ЦЭ находится в G2 стадии клеточного цикла. Приоритетными являются полученные данные, свидетельствующие о способности малых ЭЦ выходить в циркуляцию, что говорит о том, что восполнение популяции ЦЦ происходит не только за счет «зрелых» клеток, но и за счет клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением. В работе выявлено обогащение популяции клеток малыми клетками при посадке на ламинин. Клетки ЦЭ и субпопуляции клеток ЦЭ при культивировании на ламинине остаются жизнеспособными в течение длительного времени и формируют колоние-подобные агрегаты малых клеток, обладающих пролиферативной активностью. Малые ЭЦ окрашиваются АТ к транскрипционному фактору, маркеру стволовых клеток, Oct-4 *in vivo* и *in vitro*. Характеристики малых клеток свидетельствуют о том, что малые ЭЦ проявляют свойства стволовых клеток.

Теоретическое и практическое значение работы

Работа имеет фундаментальную направленность. Полученные данные вносят существенный вклад в область изучения механизмов восполнения популяции ЦЦ в ответ на травмирование у морских звезд, а также предоставляют новый материал для сравнительного анализа эволюционного многообразия феномена регенерации. Теоретические результаты могут быть использованы в курсах сравнительной гистологии, зоологии беспозвоночных и биологии стволовых клеток.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 2 статьи в отечественных рецензируемых журналах, 2 статьи в материалах симпозиумов и 11 тезисов. Материалы диссертации были представлены на Международной конференции «Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия», (Санкт-Петербург, 2004 г.), Всероссийском симпозиуме «Биология клетки в культуре», (Санкт-Петербург, 2006 г.), Двенадцатой и Тринадцатой Санкт-Петербургской ассамблеях молодых ученых и специалистов, (Санкт-Петербург, 2007 г. и 2008 г.), VIII, IX, X и XII научных сессиях Морской Биологической Станции Санкт-Петербургского Университета, (Санкт-Петербург, 2007, 2008, 2009 и 2011 гг.), Школе-конференции для молодых ученых «Методы культивирования клеток», (Санкт-Петербург, 2008 г.), Всероссийском симпозиуме по биологии клетки в культуре «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий» (Санкт-Петербург, 2009 г.), III и IV Всероссийских с международным участием конгрессах студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия», (Нижний Новгород, 2010, Воронеж, 2011 г.), II Всероссийской конференции с международным участием «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» (Санкт-Петербург, 17–19 октября 2011 г.) и на научных семинарах Отдела клеточных культур Института цитологии РАН и ББС ЗИН РАН, мыс Каргеш. Диссертационная работа апробирована на научном семинаре Отдела клеточных культур Института цитологии РАН 29 июня 2011 г.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литерату-

ры, включающего ссылки. Диссертация изложена на ___ страницах. Иллюстративный материал содержит 35 рисунков и 8 таблиц.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (#7852.2006.4), научной программы СПб НЦ, грантов правительства Санкт-Петербурга для студентов, аспирантов вузов и академических институтов 2007 и 2008 гг. и грантом правительства Санкт-Петербурга в сфере научной и научно-технической деятельности 2011 г.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор экспериментального материала и часть экспериментов проводили в сентябре 2005–2011 гг. на базе ББС ЗИН РАН (Кандалакшский залив, губа Чупа, мыс Каргеш).

Объект исследования. Особей *Asterias rubens* L. (тип Echinodermata, кл. Asteroidea) диаметром 10–12 см собирали в районе о-ва Феттах и содержали в садках на глубине 3–5 метров в течение всего времени проведения экспериментов. Для анализа пролиферативной активности клеток исследуемых тканей *in vivo* при помощи анализа включения BrdU отбирали животных меньшего размера (диаметром 5–6 см) и содержали в термостатируемой комнате при +10°C. В каждый эксперимент брали 4–6 особей *A. rubens*.

Условия травмирования животных. Звездам отрезали кончик луча, максимально спускали ЦЖ, после чего полость тела животных промывали 10–15 мл фильтрованной морской воды (Козлова и др., 2006). При таком травмировании в целомической полости остается менее 10 % клеточных элементов. Выделение суспензий клеток проводили непосредственно после травмирования («травма₀» или T₀), через 5 ч, 3 или 7 сут после травмирования (T_{5ч}, T_{3сут} и T_{7сут} соответственно).

Выделение суспензий клеток ЦЖ, ЦЭ, а также субпопуляции клеток, слабо связанных с ЦЭ (ЦЭ-с). Суспензии ЦЦ контрольных и травмированных животных получали, отрезая кончик луча и спуская ЦЖ в пробирку с равным объемом CMFSS (солевой раствор без Ca²⁺ и Mg²⁺ (Kanungo, 1982): NaCl — 25,5 г; KCl — 0,8 г; Na₂SO₄ — 3 г; HEPES — 2,86 г; pH — 7,2–7,4, до 1 л H₂O дист.) с добавлением ЭДТА до конечной концентрации 15 мкМ для предотвращения образования агрегатов клеток. Для получения суспензий клеток ЦЖ-T₀ отбирали последние 2 мл промывки полости тела морской водой, содержащие ЦЦ. Суспензии клеток ЦЭ выделяли методом ферментативной диссоциации (обработка 0,05–0,1 %-ным раствором коллагеназы краба (Биолот, Россия) в течение 20 мин).

Суспензии клеток, слабо связанных с ЦЭ выделяли, собирая клетки, содержащиеся в растворе CMFSS после первичной промывки фрагментов ЦЭ. Данная субпопуляция клеток была рассмотрена отдельно и определена как популяция клеток, слабо связанных с ЦЭ (ЦЭ-с).

Суспензии клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-с осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1800 об/мин и ресуспендировали в CMFSS. Дальнейшие манипуляции с клеточными суспензиями определялись характером каждого из последующих экспериментов — клетки либо фиксировали параформальдегидом (ПФА), добавляя ПФА до конечной концентрации ПФА — 4 %), либо проводили эксперименты с живыми клетками (см. далее).

Анализ пролиферативной активности клеток *in vivo* осуществляли методом включения аналога тимидина — бромдеоксиуридина (BrdU). Эксперименты проводили в течение 3 сезонов.

Животным диаметром 5–6 см вводили BrdU за 5 ч до фиксации клеток (200 мкл раствора 10 мг/мл). Выделенные суспензии фиксировали 4% ПФА в течение 10 мин, после чего сажали на полилизин (Пл) (Sigma, США) на 1 ч, обрабатывали 0,5 % Тритоном X-100 и проводили гидролиз ДНК 2N HCl. Клетки инкубировали с АТ мыши к BrdU (BD Bioscience, США) (1:4) при +4 °С в течение ночи. Окраску вторыми АТ, конъюгированными с Alexa 488 Fluor, проводили в течение 1,5 ч. Для определения ядерной локализации BrdU клетки также окрашивались DAPI (Sigma).

Иммунофлуоресценция. Окраску суспензий, фиксированных 4%-ным ПФА, АТ к НЗ-фосфогистону, Oct-4 и тубулину проводили после посадки на Пл в течение 1 ч. Клетки пермеабилizировали 0,1 %-ным раствором Тритона X-100, инкубировали с соответствующими первыми АТ в течение ночи при +4 °С и окрашивали соответствующими вторыми АТ Alexa 488 в течение 1,5 ч при $t_{\text{комн}}$. Ядра окрашивали красителем DAPI.

Гистологический анализ суспензий клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-с. Суспензии клеток, фиксированные в 4 % -ном ПФА, наносили на Пл на 1 ч. и окрашивали азур-эозином (0,1%-ым водным раствором азур II и 0,1%-ым спиртовым раствором эозина). Выделяли различные классы, опираясь на морфометрические характеристики — диаметр и форму клетки, диаметр ядра, наличие или отсутствие гранул в цитоплазме, интенсивность окраски ядра и гранул красителями. Далее высчитывали долю каждого класса клеток.

Анализ возможности миграции клеток ЦЭ-с из состава ЦЭ. Вырезали абортальную часть луча и во внутреннюю часть заливали 2 мл CMFSS, морской воды или ЦЖ. Суспензии клеток, вышедших из состава эпителия, через 15 мин фиксировали в ПФА. Была проведена оценка общего количества клеток (абсолютное количество на одну звезду) в разных субпопуляциях ЦЭ после подсчета клеток в камере Горяева и оценка доли малых клеток после окраски азур-эозином.

Анализ суспензий клеток методом проточной цитофлуориметрии. Суспензии клеток фиксировали в 4 %-ном ПФА, обрабатывали 0,1%-ным Тритоном X-100, после чего окрашивали пропидий йодидом в концентрации 40 мкг/мл (Serva, Германия) с добавлением 0,25 мг/мл РНКазыА. Суспензии клеток анализировали при помощи цитофлуориметра Epics XL (Beckman Coulter). Обсчитывали не менее 10^4 клеток. В качестве маркера для определения положения гаплоидного набора использовали сперматозоиды *A. rubens*.

Определение локализации малых ЭЦ в составе ЦЭ проводили, анализируя случайно выбранные фрагменты контрольного ЦЭ методами окраски полутонких срезов метиленовым синим и иммунофлуоресцентного анализа тотальных препаратов после окраски АТ к тубулину (whole-mount) (Ott, 2008).

Культивирование клеток ЦЖ и ЦЭ. Суспензии клеток дважды промывали раствором CMFSS, содержащем коктейль антибиотиков (пенициллин — 200 ед/мл, стрептомицин — 200 мкг/мл, гентамицин — 40 мкг/мл) и ресуспендировали в модифицированной среде Лейбовича L-15 (Odintsova, Khomenko, 1993) (1100 мосм) с добавлением 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия) и гентамицина (40 мкг/мл). Клетки в концентрации $1-2 \times 10^6$ клеток в мл сеяли в 24-луночные

платы, флаконы (Nunc, 25 см², США) и одновременно на стекла диаметром 13 мм (Menzel-Glaser, Германия).

Анализ пролиферативной активности клеток в культуре. Для анализа в лунку с 0,5 мл среды добавляли раствор BrdU до конечной концентрации 20 мкМ и инкубировали в течение 12 ч. Оценку уровня включения BrdU определяли в суммарной клеточной суспензии, полученной после сбивания клеток с поверхности лунок с помощью пипетирования через 12 ч, 5 и 15 сут, а также через 2 мес культивирования. При культивировании клеток на ламинине оценку уровня включения BrdU определяли как для прикрепленных, так и неприкрепленных к ламинину клеток, через 12 ч, 5 сут, а также через 1 мес культивирования.

Выбор субстрата для культивирования. Морфологию прикрепленных и распластанных клеток ЦЖ и ЦЭ анализировали после посадки на иммобилизованные лиганды — фибронектин (Фн), ламинин 2/4 (Лм) и на неспецифические субстраты — полилизин (Пл) и стекло (Ст). Сравнивали количество клеток, способных прикрепиться к тому или иному субстрату.

Нанесение лигандов на стекла. Фн (Sigma, США), Лм, любезно предоставленный И.В. Ворониной (ИИЦ РАН), а также Пл (Sigma, США) наносили на покровные стекла диаметром 13 мм (Menzel-Glaser, Германия) в концентрации 20 мкг/мл и инкубировали при 4 °С в течение ночи. Затем стекла отмывали раствором CMFSS, инкубировали в растворе 1 % BSA при 37 °С в течение 1 ч и вновь отмывали раствором CMFSS.

Распластывание клеток на различных субстратах, окраска препаратов родамин-фаллоидином и DAPI. 100 мкл суспензий клеток (1×10^6 в мл для ЦЦ и 2×10^6 в мл для суспензии клеток ЦЭ) наносили на покровные стекла, на стекла, покрытые лигандами или Пл, и выдерживали при температуре +16 °С в течение 1 ч. Прикрепившиеся и распластанные клетки фиксировали 4 %-ным ПФА, пермеабелизовали 0,1 %-ным раствором Тритона X-100, после чего окрашивали родамин-фаллоидином (Invitrogen, США) и DAPI.

Для качественного анализа выделяли несколько условных классов клеток в зависимости от размера и формы клеток, структуры, размера и интенсивности свечения ядер после окраски DAPI, а также структуры актинового цитоскелета, и подсчитывали количество клеток, принадлежащих к данному классу. Интенсивность окраски ядер, выраженную в процентном отношении содержания синего цвета на снимках препаратов, определяли с помощью программы ImageJ.

Культивирование клеток ЦЭ на Лм. Суспензии клеток, дважды отмытые в CMFSS с коктейлем антибиотиков ресуспендировали в стерильной морской воде. Клетки в концентрации $1-2 \times 10^6$ клеток в 1 мл (суммарно 1 мл) сеяли в 24-луночные платы на покровные стекла, покрытые Лм. Через 1 ч инкубации при +16 °С, удаляли не прикрепившиеся клетки и лунки мягко промывали стерильной морской водой, после чего в каждую лунку добавляли 500 мкл среды Лейбовича L-15.

Микроскопия. Препараты, окрашенные азур-эозином и метиленовым синим анализировали с помощью светового микроскопа Axioscop или Pascal (об. $\times 100$). Наблюдения за состоянием и поведением клеток в культуре проводили с использованием инвертированного микроскопа Биолам (Россия) и Nicon (Германия) (об. $\times 6,3$, $\times 10$ и $\times 20$). Иммунофлуоресцентные препараты анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (об. $\times 63$ и $\times 100$). Для возбуждения флуоресценции использовали аргоновый лазер с длиной волны 488 нм для вторых антител Alexa 488;

HeNe-лазер с длиной волны 543 нм для Alexa 568 и родамин-фаллоидина и полупроводниковый лазер с длиной волны 405 нм для визуализации окраски DAPI. В случае тройной окраски применяли последовательное сканирование.

Статистическая обработка результатов. Для статистической обработки данных были использованы компьютерные программы STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc.) и Microsoft Excel. Подсчет долей клеток (после окраски BrdU, AT к H3-фосфогистону, а также доли клеток каждого типа при гистологическом анализе и после окраски прикрепленных клеток родамин-фаллоидином) проводили в нескольких случайных полях зрения таким образом, чтобы общее количество подсчитанных клеток было не менее 300. Значимость различий оценивали с вероятностью 0,05 при помощи пакета однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием критерия множественного сравнения Фишера (Fisher post-hoc test) (Winer et al. 1991).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проллиферативная активность клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-с *in vivo*. Анализ включения BrdU в клетки ЦЖ показал, что *ДНК-синтетическая активность* ЦЦ очень мала — обнаруживали лишь единичные ЦЦ, включающие BrdU, причем, доля этих клеток в составе ЦЖ не увеличивалась в ответ на травмирование. Включение BrdU в клетки ЦЭ наблюдали стабильно в течение трех сезонов, их доля не превышала 0,3 %. Воспроизводимых изменений в ответ на травмирование не выявлено. Доля клеток, включающих BrdU в суспензии клеток ЦЭ-с, составляла не более 0,2 % и также не изменялась.

Анализ морфологии ЦЦ, включающих BrdU показал, что, главным образом, включения обнаруживали в малые клетки ($d=4$ мкм) с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, близким к единице (рис. 1, А). В очень редких случаях наблюдали включения и в клетки с видимой цитоплазмой.

В суспензиях клеток ЦЭ и ЦЭ-с включения BrdU обнаруживали в двух типах клеток (рис. 1 Б, а, б): 1. малые, с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, дискретно окрашенным DAPI ядром и примембранным прилежанием хроматина (малые эпителиоциты (ЭЦ) 1 типа) ($d=4-6$ мкм); 2. малые клетки с плотно окрашенным DAPI ядром (конденсированный хроматин) и, иногда, с небольшой видимой цитоплазмой (малые ЭЦ 2 типа) ($d=2-3$ мкм). Согласно морфометрическим характеристикам

и характеру окраски ядер DAPI, именно малые клетки 1 типа с включения-

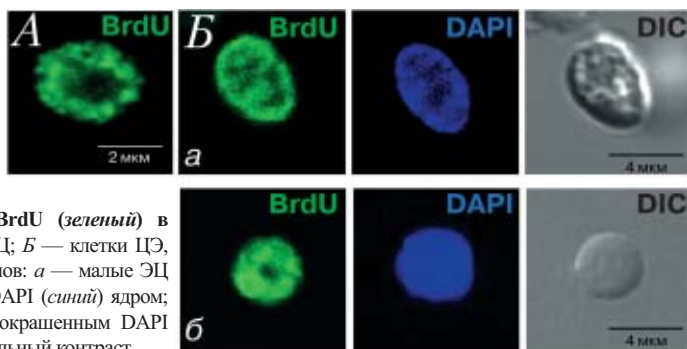


Рис. 1. Включение BrdU (зеленый) в клетки ЦЖ и ЦЭ: А — ЦЦ; Б — клетки ЦЭ, включающие BrdU двух типов: а — малые ЭЦ с дискретно окрашенным DAPI (синий) ядром; б — малые ЭЦ с плотно окрашенным DAPI ядром. DIC — дифференциальный контраст

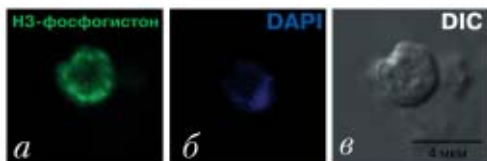


Рис. 2. Клетки ЦЭ после окраски антителами к H3-фосфогистону (зеленый) и DAPI (синий); DIC — дифференциальный контраст

окрашивая суспензии АТ на H3-фосфогистон, который является маркером митотических клеток (Hendzel et al., 1997). Окраска обнаруживалась лишь в единичных ЦЦ. В ЦЭ окрашивались малые ЭЦ с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 2). Доля окрашенных клеток составляла не более 0,05 % и также не изменялась после травмирования.

Таким образом, способность включать BrdU, а также окрашиваться АТ к H3-фосфогистону — характеристика малых клеток ЦЖ и ЦЭ, обладающих высоким ядерно-цитоплазматическим отношением.

Гистологический анализ суспензий клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-с после окраски азур-эозином, определение доли малых клеток в составе популяций. Вышеизложенные данные показали необходимость более детально исследовать популяции клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-с, чтобы определить долю малых клеток и их распределение в составе популяций, а также изменение их доли в ответ на травмирование. Точка T_0 введена для того, чтобы проконтролировать степень вымывания ЦЦ и выяснить, как процедура вымывания влияет на состав популяций клеток ЦЭ. Среднее суммарное количество ЦЦ на одну звезду диаметром 8–10 см, для контрольных животных ($n=4$) составляет около 30 млн, а в 2 последних мл промывки 2–3 млн клеток.

Анализ популяции клеток ЦЖ. Общепринятой классификации ЦЦ иглокожих в настоящее время не существует. Описания структуры ЦЦ и их классификация, предлагаемая разными авторами, значительно зависят от методических особенностей (оптический или электронно-микроскопический уровень исследования, выбранный метод фиксации, изучение клеток в прикрепленном состоянии или в суспензионном состоянии). Доминирующим типом клеток в составе ЦЖ называют амебоцитами или фагоцитами (Smith, 1981; Коренбаум, Воробьев, 1988; Pinsino

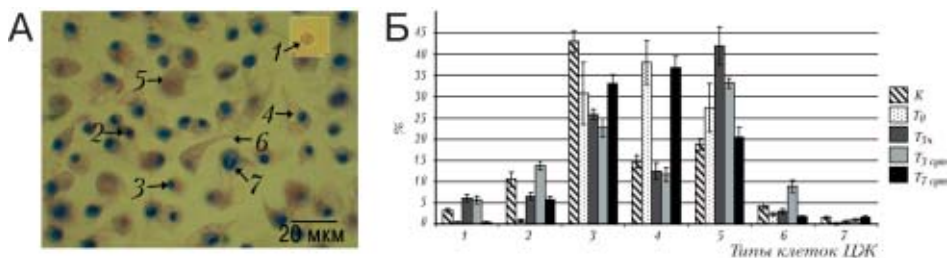


Рис. 3. Типы ЦЦ после окраски азур-эозином (А) и динамика клеточного состава ЦЖ в ответ на травмирование (Б): А — типы ЦЦ: 1 — малые ЦЦ с дискретно окрашенным ядром; 2 — малые ЦЦ с «плотным» ядром; 3 — мелкие агранулоциты; 4 — крупные агранулоциты; 5 — эозинофильные гранулоциты; 6 — удлинённые ЦЦ; 7 — двуядерные ЦЦ; Б — динамика состава популяции ЦЦ в ответ на травмирование

et. al., 2007), лимфоцитами (JanGoux and Vanden Bossche. 1975) или агранулоцитами (Козлова и др., 2006). В настоящей работе предложена собственная классификация ЦЦ после окраски суспензий клеток азур-эозином.

Выделено 7 условных классов клеток ЦЖ — малые клетки двух типов, мелкие и крупные агранулоциты, гранулоциты, веретенновидные и многоядерные ЦЦ (рис. 3). Доминирующими типами ЦЦ являются гранулоциты и агранулоциты. Гранулоциты характеризуются слабоокрашенным ядром ($d_n = 4$ мкм) и наличием двух и более эозинофильных гранул по цитоплазме ($d_{cvt} = 8-12$ мкм). В ответ на истощение ЦЖ наблюдается значительное увеличение доли гранулоцитов к 5 ч и восстановление до контрольного уровня к 7 сут после травмирования. Показано, что ЦЦ осуществляют синтез биологически активных веществ, имеющих защитное и регуляторное значение (Patruno et al., 2001; Pinsino et al., 2007; Holm et al., 2008 и др.), таким образом, изменение доли гранулоцитов, по-видимому, связано с ответом на травмирование. Описаны агранулоциты двух типов — мелкие ($d_n = 3,3-4,2$; $d_{cvt} = 5-6,5$ мкм) и крупные ($d_n = 3,3-4$; $d_{cvt} = 7-11$ мкм), оба типа характеризуются азурофильным ядром и петалоидной формой. Агранулоциты имеют сложную динамику — наблюдается значительное увеличение доли крупных агранулоцитов в точке T_0 , что может быть связано с более медленным «вымыванием» этих клеток из целомической полости. Двухядерные и веретенновидные ЦЦ представлены в незначительной доле (рис. 3, Б, 6, 7), последние были обнаружены и другими авторами (JanGoux, Vanden Bossche, 1975).

Наиболее интересующий класс ЦЦ — малые ЦЦ. Выявлено 2 типа малых клеток — клетки, имеющие дискретно окрашенное азуром ядро ($d=4$ мкм) (рис. 3, Б, тип 1) и клетки с «плотно» окрашенным азуром ядром ($d=4$ мкм) (рис. 3, Б, тип 2). Как показано ранее, включение BrdU наблюдали именно в клетки с дискретно окрашенным ядром. Для обоих типов малых клеток показано значительное уменьшение их доли в точке T_0 — в последней фракции промывки полости тела животных с последующим увеличением их доли уже через 5 ч после травмирования. Появление малых клеток обоих типов уже через 5 ч при очень низкой пролиферативной активности ЦЦ свидетельствует о том, что эти клетки могут мигрировать из определенных клеточных депо.

Таким образом, мы подтвердили ранее полученные данные, демонстрирующие увеличение доли малых клеток в ответ на травмирование (Козлова и др., 2006), однако нам удалось выделить 2 типа малых ЦЦ с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением размером около 4 мкм, различающихся по структуре ядра.

Анализ популяции клеток ЦЭ после окраски суспензий клеток ЦЭ азур-эозином проведен впервые. Главная задача заключалась в определении состава и выявлении доли клеток того или иного типа. Выделено 7 типов клеток: доминирующие мелкие агранулоциты ЦЭ (38 %; $d_n = 2,5-3,5$; $d_{cvt} = 3-5$ мкм), которые впоследствии были идентифицированы как жгутиковые клетки ЦЭ после окраски АТ к тубулину (рис. 4, А, 3, Б); крупные агранулоциты (рис. 4, А, 4) (11 %; $d_n = 3,3-4$; $d_{cvt} = 7-10$ мкм); крупные эозинофильные гранулоциты (рис. 4, А, 5, 6) (15 % $d_n = 3,3-4$; $d_{cvt} = 8-11$ мкм); азурофильные гранулоциты (рис. 4, А, 5) (8 %; $d_n = 3,3-4$; $d_{cvt} = 6-7$ мкм) малые ЭЦ с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением двух типов (рис. 4, А, 1а, 1б), а также морулярные ЭЦ (<2 %; $d_n = 3,5-5$; $d_{cvt} = 10-14$ мкм) и безъядерные элементы (рис. 4, А, 7). Выявлено, что безъядерные элементы окрашиваются родамин-фаллоидином или АТ к тубулину, демонстрируют сложную структуру актинового или тубулинового цитоскелета.

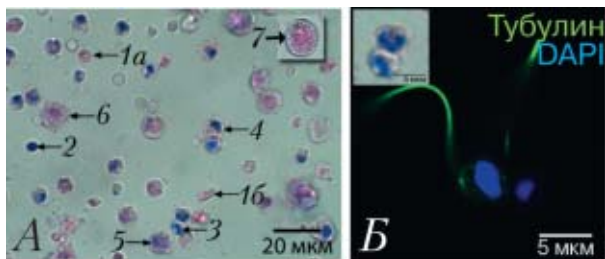


Рис. 4. Клетки ЦЭ после окраски азур-эозином: А — 1а, 1б: малые ЭЦ с дискретно окрашенным ядром; 2 — малые ЭЦ с плотно окрашенным ядром; 3 — мелкие агранулоциты ЦЭ; 4 — крупные агранулоциты; 5 — азурофильные гранулоциты; 6 — эозинофильные гранулоциты; 7 — морулярные клетки; Б — идентификация малых агранулоцитов после окраски АТ на тубулин (зеленый) и DAPI (синий).

Крупные агранулоциты и эозинофильные гранулоциты имеют сходные морфометрические характеристики с агранулоцитами и гранулоцитами ЦЖ.

Выявлены малые ЭЦ двух типов. Малые ЭЦ 1 типа (5%) характеризуются дискретно окрашенным ядром диаметром 4 мкм. Малые ЭЦ 2 типа (21%) характеризуются «плотным» ядром и диаметром 2–3 мкм. Для обоих типов характерно значительное уменьшение их доли в точке T_0 , что предполагает их «вымывание» при процедуре промывки животных. Уже через 5 ч доля малых ЭЦ восстанавливается до контрольного уровня и сохраняется до 7 сут после травмирования.

Морфометрические характеристики малых ЭЦ 1 типа после окраски азур-эозином и DAPI, а также их доля в составе популяций, говорят о том, что это тот же тип клеток, которые могут включать BrdU.

Анализ популяции клеток ЦЭ-с. В популяции клеток ЦЭ-с присутствуют те же типы клеток, которые наблюдали в составе популяций клеток ЦЭ, но в других соотношениях долей. Привлекают внимание крупные агранулоциты и эозинофильные гранулоциты, присутствие которых показано в составе ЦЖ — их доля изменялась в ответ на травмирование.

Самым важным результатом является факт обогащения этой субпопуляции малыми ЭЦ — доля малых ЭЦ 1 типа с дискретно окрашенным ядром составляет 50%, что значительно превышает долю малых ЭЦ в составе ЦЭ, а доля клеток 2 типа составляет 20% в контроле. Следует отметить, что в точке T_0 показано значительное уменьшение доли малых ЭЦ 1 типа, увеличение через 5 ч и снижение через 3 и 7 сут после травмирования. Доля малых ЭЦ 2 типа подвержена меньшим изменениям (рис. 5).

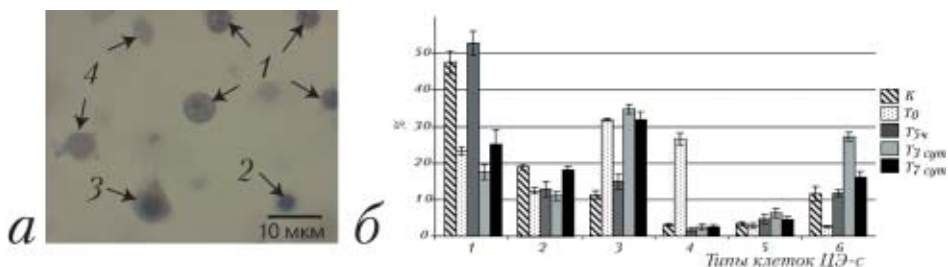


Рис. 5. Клетки ЦЭ-с после окраски азур-эозином (А) и динамика клеточного состава в ответ на травмирование (Б): 1 — малые ЭЦ с дискретно окрашенным ядром; 2 — малые ЭЦ с плотно окрашенным ядром; 3 — мелкие агранулоциты ЦЭ; 4 — крупные агранулоциты; 5 — азурофильные гранулоциты; 6 — эозинофильные гранулоциты; 7 — морулярные клетки

Таким образом, в составе популяций клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-с выявлены типы клеток, обладающие сходными морфометрическими характеристиками — крупные агранулоциты, гранулоциты и малые ЭЦ I типа. Изменения в составе популяций клеток ЦЖ и ЦЭ в ответ на травмирование касались именно этих типов — малых ЭЦ I типа и крупных агранулоцитов и гранулоцитов. В составе ЦЭ обнаружена новая субпопуляция клеток, слабо связанных с ЦЭ, обогащенная малыми клетками двух типов, доля которых изменяется в ответ на травмирование. Только часть популяции малых ЭЦ проявляет пролиферативную активность.

Оценка возможности миграции малых эпителиоцитов из «условно-интактного» эпителия. Поскольку выделение субпопуляции клеток ЦЭ-с связано непосредственно с повреждением ЦЭ, встает вопрос, не является ли это результатом травмирования — клетки из фрагментов эпителия могли выходить из краевых раневых частей в солевой раствор при отделении ЦЭ. Второй вопрос — не связан ли выход клеток ЦЭ с тем, что фрагменты промывались CMFSS — морской водой, не содержащий Ca^{2+} и Mg^{2+} . Поэтому, мы проверили, могут ли клетки свободно покидать ткань в случае, если ЦЭ травмируется незначительно.

Приблизительная оценка количества клеток (абсолютное количество на одну звезду) в разных субпопуляциях ЦЭ и ЦЖ показывает, что клетки могут выходить во все предложенные жидкости, максимальное количество в CMFSS (6 млн) и примерно одинаковое количество в морскую воду и ЦЖ (2,5 млн) при исходном суммарном количестве клеток в ЦЖ 11 млн.

Анализ состава этих клеточных популяций после окраски азур-эозином показал, что в «условно-интактных» ситуациях только малые ЭЦ с дискретно окрашенным ядром (I типа) выходят из состава ЦЭ. Их доля составляет около 60 % среди клеток, выходящих в CMFSS и в морскую воду, и около 40 % клеток, выходящих в ЦЖ, тогда как клетки с плотно окрашенным ядром выявлены в суспензиях, выделенных при значительном травмировании ткани (рис. 6).

Таким образом, именно малые ЭЦ I типа с дискретно окрашенным ядром способны выходить из состава эпителия в целомическую полость.

Анализ суспензий ЦЭ и ЦЭ-с клеток методом проточной цитофлуориметрии после окраски пропидий йодидом показал, что в составе популяций присутствуют 2 группы клеток — клетки меньшего и большего размера. Доля малых ЭЦ в каждой популяции клеток согласуется с подсчетами, полученными ранее при гистологическом анализе и, в случае ЦЭ-с, составляет около 50% (рис. 7). Кроме того, показано, что часть популяции малых клеток в составе субпопуляции ЦЭ-с находятся в G2 стадии клеточного цикла.

Определение локализации малых ЭЦ в составе ЦЭ. Выявление субпопуляции клеток ЦЭ, обогащенной малыми ЭЦ I типа показало необходимость опре-

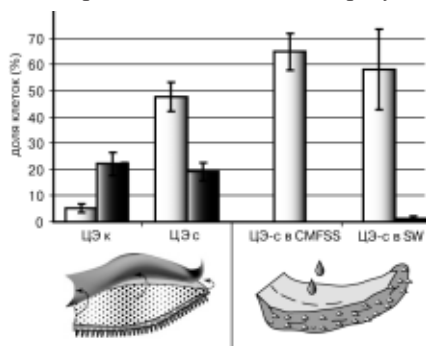


Рис. 6. Соотношение малых клеток двух типов при разных способах выделения субпопуляции клеток ЦЭ-с: светлые столбики — малые эпителиоциты с дискретно окрашенным ядром; темные столбики — малые эпителиоциты с «плотно» окрашенным ядром

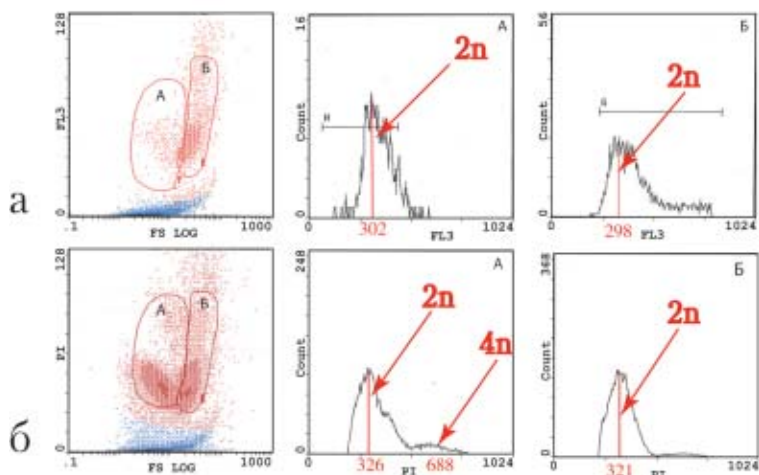
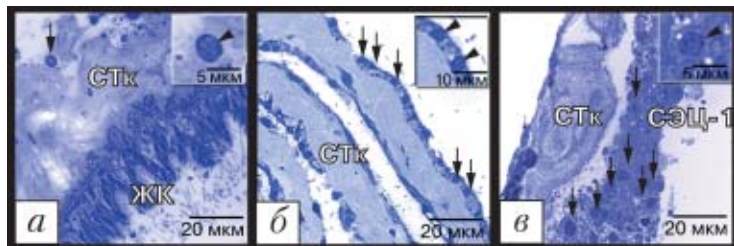


Рис. 7. Анализ популяций клеток ЦЭ (а) и ЦЭ-с (б) методом проточной цитофлуориметрии (стрелками указаны положения диплоидного и тетраплоидного набора)

деления локализации этих клеток в составе ЦЭ. На полутонких срезах ЦЭ видны 3 зоны локализации малых ЭЦ I типа: 1. как единичные клетки в слое соединительной ткани; 2. в участках целомического эпителия, обедненных жгутиковыми клетками; 3. как скопления клеток в свободных от ресничного эпителия участках (рис. 8). Окрашивание фрагментов ЦЭ АТ к тубулину и DAPI на тотальных препаратах (whole-mount) подтверждают, что малые клетки ЦЭ локализуются в участках ЦЭ, обедненных жгутиковыми клетками (рис. 9).

Культивирование клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-с. Одним из методов, моделирующих процессы, происходящие *in vivo*, в частности, процессы дифференцировки и трансдифференцировки клеток, является метод культивирования. Несмотря на то, что постоянных клеточных культур морских беспозвоночных до сих пор не существует, широко используются первичные культуры клеток различных тканей (Naganuma et al., 1994; Ермак, Одинцова, 1996). Для получения модели, позволяющей исследовать закономерности восполнения популяции клеток ЦЖ после травмирования и дифференцировку ЦЦ *in vitro*, были отработаны методы выделения и культивирования клеток на разных сроках после «тяжелого» травмирования жи-

Рис. 8 Локализация малых клеток в составе ЦЭ. Окраска полутонких срезов метиленовым синим: а — малые клетки ЦЭ в слое соединительной ткани; б — малые клетки в участках ЦЭ, обедненных жгутиковыми



ми клетками; в — скопления малых клеток в участках ЦЭ, обедненных жгутиковыми клетками. ЖК — жгутиковые клетки; СТк — соединительная ткань; СЭЦ-1 — скопления ЭЦ I типа

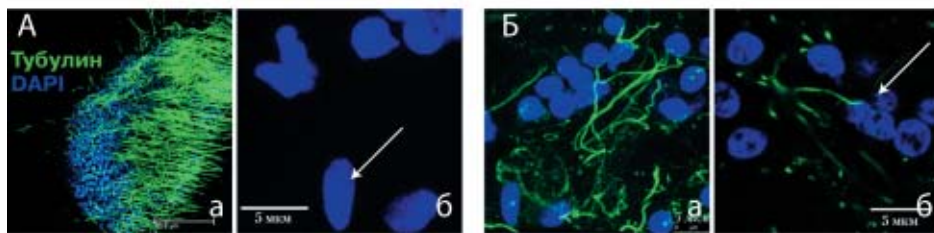


Рис. 9. Локализация малых клеток ЦЭ в участках, обедненных жгутиковыми клетками после окраски тотальных препаратов (whole-mount) АТ к тубулину (зеленый): А — участок ЦЭ, составленный жгутиковыми клетками; Б — участок ЦЭ, обедненный жгутиковыми клетками. Стрелками указаны ядра разных типов в различных участках ЦЭ после окраски DAPI (синий)

вотных, а также проведен анализ поведения и пролиферативной активности клеток в культуре.

Показано, что поведение ЦЦ и клеток ЦЭ в культуре зависело от срока, прошедшего после травмирования животных, на котором были выделены клетки. Клетки ЦЖ, выделенные через 5 ч после травмирования формируют «сети» и агрегаты (рис. 10, А, б). Клетки, выделенные от контрольных животных, а также через 3 и 7 сут после травмирования подобной активности не проявляли (рис. 10, А, а). Через 1 сут после посева ЦЦ, выделенные на всех сроках, формировали «сети», которые распались к 3 сут культивирования, кроме ЦЦ точки $T_{5ч}$, которые формировали синцитии. Через 2 мес поддержания в условиях культуры большая часть клеток погибала — значительная часть клеток имеет фрагментированные ядра или является безъядерными (рис. 10, А, в).

Для клеток ЦЭ, выделенных из контрольных животных, наблюдали формирование сетеподобных структур уже через 12–24 ч после посева (рис. 10, Б, а), в то

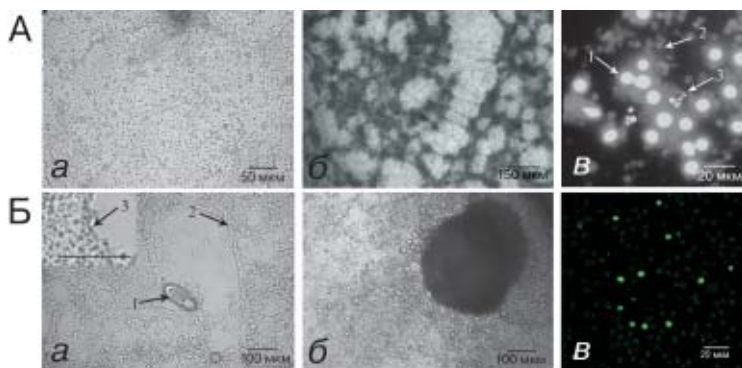


Рис. 10. Первичные культуры ЦЦ и клеток ЦЭ: А — ЦЦ: а — клетки, выделенные от контрольных животных через 12 ч культивирования; б — клетки, выделенные через 5 ч после травмирования; в — клетки через 2 мес культивирования после окраски DAPI (суммарная суспензия, полученная после мягкого сбивания клеток с поверхности культуральных сосудов пипетированием), стрелками указаны клетки с целостными ядрами (1), с фрагментированными ядрами (2) и безъядерные клетки (3); Б — клетки ЦЭ в культуре: а — клетки, выделенные от контрольных животных через 12 ч культивирования: 1 — агрегат ресничных клеток; 2 — хорошо распластанные клетки, формирующие «сети»; 3 — малые ЭЦ на поверхности распластанных клеток; б — клетки ЦЭ через 2 мес культивирования, формирование колониеподобных агрегатов; в — включение BrdU в клетки ЦЭ через 2 мес культивирования (зеленый)

время как клетки, выделенные от травмированных животных, приобретали способность к сетеобразованию лишь на 7–12 сут культивирования. По-видимому, мы наблюдали процессы, моделирующие эпителизацию раны и смену функционального состояния клеток, вызванного травмированием. Через 2 мес часть клеток погибала, но на этом фоне, для клеток ЦЭ было характерно образование колониеподобных агрегатов клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 10, Б, б). Анализ ДНК-синтетической активности клеток ЦЭ после введения BrdU через 2 месяца культивирования показал, что доля клеток, включающих BrdU, составляет 5 %, причем эти клетки характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 10, Б, в).

Выбор субстрата для культивирования. Результаты, описывающие поведение клеток *in vitro*, были получены при культивировании на поверхности гидрофильных плат и флаконов. В ходе работы было выявлено, что поверхность стекла является неподходящим субстратом для культивирования клеток *A. rubens*. Клетки, первоначально прикрепившиеся к покровному стеклу, через 1 сут культивирования мигрировали на поверхность лунки, не давая возможность проведения их иммунофлуоресцентного анализа. Таким образом, встал вопрос выбора субстрата для культивирования клеток ЦЖ и ЦЭ. Помимо этого, было необходимо охарактеризовать типы клеток, с которыми мы можем встретиться при культивировании.

Был проведен сравнительный анализ количества клеток, прикрепившихся к фибронектину (Фн), ламинину (Лм), полилизину (Пл) или стеклу (Ст) через 1 ч после нанесения суспензий клеток на подложки. Аналоги Фн и Лм человека были обнаружены у морского ежа (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, 2006), поэтому мы сочли возможным использовать эти лиганды. Пл и Ст использовали в качестве неспецифических подложек. Клетки окрашивали родамин-фаллоидином и DAPI. Количественный анализ популяций клеток, прикрепленных к той или иной подложке показал, что ЦЦ проявляют предпочтение к специфическим лигандам, Фн и Лм, а клетки ЦЭ и ЦЭ-с — к Пл.

На основании морфометрических характеристик были описаны условные классы прикрепленных клеток. Выделено 7 условных классов ЦЦ и 8 классов клеток ЦЭ и ЦЭ-с. Выявлено 3 класса клеток, имеющих сходные морфометрические характеристики во всех популяциях клеток (рис. 11). Один из этих классов — крупные клетки с фибриллами актина в цитоплазме, бледно окрашенным ядром диаметром 3–4,4 мкм и диаметром цитоплазмы 12–38 мкм (рис. 11, А, а). Последний параметр варьировал в зависимости от субстрата, что отражает разную способность к распластыванию на различных субстратах. Клетки этого типа выявлены на всех предложенных подложках, причем, для суспензий клеток всех исследуемых тканей, наиболее предпочтительным субстратом является Фн. Другой тип — малые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, которые не окрашиваются родамин-фаллоидином. Для ЦЖ и суспензий ЦЭ-с характерны 2 типа окраски ядра — дискретно окрашенные и плотно окрашенные DAPI (рис. 11, А, б, в), в то время как для малых ЭЦ структура ядра после окраски DAPI значительно различалась (рис. 11, Б).

Самой яркой характеристикой малых клеток ЦЭ и ЦЭ-с является избирательное прикрепление к Лм в контроле и через 5 ч после травмирования (до 70% в зависимости от препарата Лм, по данным экспериментов разных лет) (рис. 12, а–в), в то время как суммарно к Лм прикрепляется незначительное количество клеток,

Рис. 11. Типы клеток, выявленные в составе популяций прикрепленных клеток ЦЖ, ЦЭ и ЦЭ-с после посадки на Фн, Лм, Пл и Ст, имеющие сходные морфометрические характеристики:
А: *a* — хорошо распластанные клетки с фибриллами актина и светлым ядром; *б* — малые клетки с плотно окрашенным DAPI ядром; *в* — малые клетки с дискретно окрашенным DAPI ядром; **Б** (*a-г*) — структура малых клеток ЦЭ. Красная окраска — родамин-фаллоидин; синяя окраска — DAPI

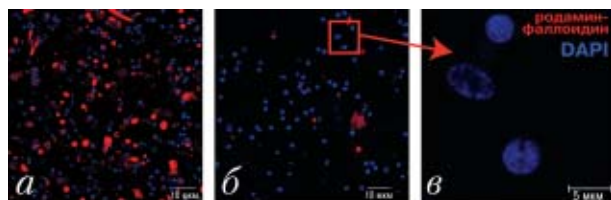
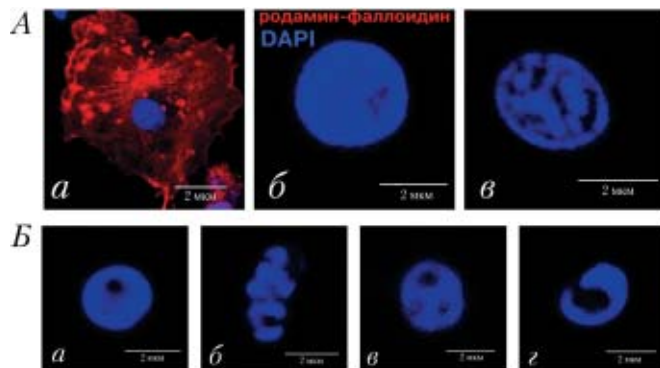


Рис. 12. Обогащение популяции клеток ЦЭ через 1 ч прикрепления ЛМ: *a* — клетки ЦЭ на Пл; *б* — клетки ЦЭ на Лм; *в* — малые клетки с дискретно окрашенным DAPI ядром на Лм. Красная окраска — родамин-фаллоидин; синяя окраска — DAPI.

по сравнению с другими субстратами (17% от количества клеток в одном поле зрения, прикрепляющихся к Пл). Такая избирательная адгезия свидетельствует о высокой специализации этих клеток. Высокая доля малых ЭЦ с дискретно окрашенным ядром на Лм после посадки суспензий клеток ЦЭ-с сохраняется и через 3 сут после травмирования.

В ответ на травмирование происходит изменение доли прикрепленных крупных клеток с фибриллами актина и малых клеток во всех исследуемых популяциях, что говорит об изменении свойств поверхностных рецепторов клеток, отвечающих за взаимодействие с предложенными субстратами.

Избирательное прикрепление малых ЭЦ к Лм и изменение их адгезивных свойств, вызванное травмированием, может свидетельствовать о тонких взаимоотношениях Лм, белка базальных мембран, и малых клеток. Из литературных источников известно, что

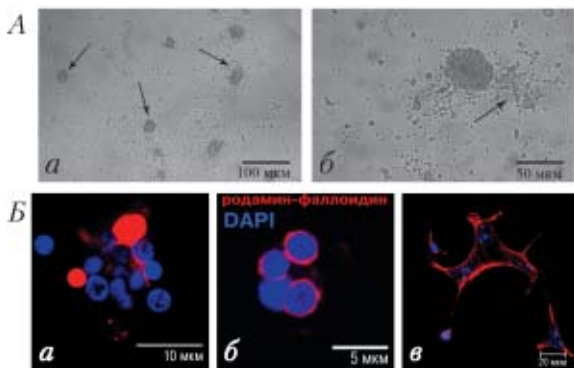
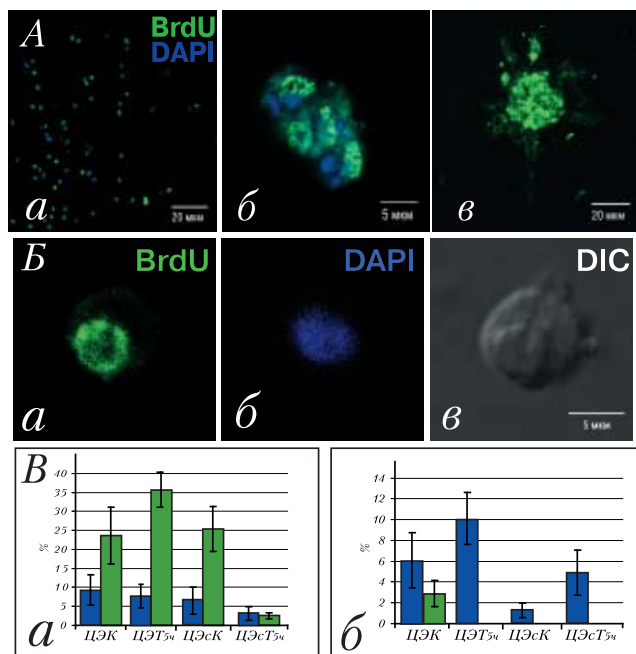


Рис. 13. Клетки ЦЭ при культивировании на Лм: *A: a* — 5 сут. в культуре; *б* — 1 мес. культивирования. Стрелками указаны колоние-подобные агрегаты и «сети» эпителиоцитов; *Б: a, б* — иммунофлуоресцентный анализ колоние-подобных агрегатов, состоящих из малых клеток ЦЭ через 5 сут культивирования; *в* — малые клетки ЦЭ на поверхности хорошо распластанных ЦЦ-подобных клеток, 8 сут культивирования. Окраска родамин-фаллоидином (красный) и DAPI (синий).

Лм является ключевым белком в развитии у морских ежей: в момент гастрюляции предшественники мезенхимных клеток приобретают способность прикрепляться к Лм (Katow, 1986; Hertzler, McClay, 1999). Клетки в этот момент характеризуются высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, что является одной из черт стволовых клеток (Rinkevitch, 2009; Исаева и др., 2009; Isaeva, 2011).

Культивирование клеток ЦЭ и ЦЭ-с на ламинине. Клетки ЦЭ и ЦЭ-с, нанесенные на стекла, покрытые Лм, не мигрируют на пластик и остаются жизнеспособными в течение 1–2 мес. Уже на 5 сут культивирования клетки формировали колонии-подобные агрегаты (рис. 13, А). Иммунофлуоресцентный анализ прикрепленных клеток показал, что агрегаты состоят из малых клеток ЦЭ I типа с дискретно окрашенным ядром диаметром 4 мкм, причем на 5 сут клетки могут окрашиваться родамин-фаллоидином в виде небольшого ободка F-актина (рис. 13, Б, а, б). На более поздних сроках малые ЭЦ обнаруживаются на поверхности хорошо распластанных клеток (рис. 13, Б, в). Агрегаты сохранялись в течение всего периода содержания ЭЦ в культуре. Кроме того, наблюдали образование «сетей» клеток ЦЭ, которые также сохранялись на стеклах, покрытых Лм на протяжении длительного времени (рис. 13, А, б). Клетки ЦЭ-с при культивировании на Лм вели себя аналогичным образом.

Анализ пролиферативной активности проводили как для прикрепленных к Лм клеток, так и клеток, открепившихся в процессе культивирования (рис. 14, А, Б). Через 12 ч культивирования прикрепленные к ламинину клетки проявляют ДНК-синтетическую активность на более высоком уровне, чем наблюдали *in vivo*, доля этих клеток составляла 7,7–9,9 % (рис. 14, В, а). Через 5 сут культивирования доля клеток, включающих BrdU, составляет 20–35 %, причем высокая доля сохраняется, по крайней мере, в течение месяца. На этот момент клетки обнаружи-



ваются в больших скоплениях, подсчет клеток в которых затруднен (рис. 14, А, в). Следует отметить, что клетки ЦЭ-с, выделенные через 5 ч после травмирования характеризуются самой низкой пролиферативной активностью (3 %).

Анализ пролиферативной активности клеток, открепившихся в ходе культивирования, показал, что способность включать BrdU — характеристика малых ЭЦ с плотно окрашиваемым DAPI ядром (2–3 мкм) и видимой цитоплазмой (рис. 14 В, а–в). Доля этих клеток ниже, чем в случае клеток, прикрепленных к ламинину, и достигает максимума 10 % для клеток ЦЭ, выделенных через 5 ч после травмирования. В ходе культивирования клетки этого типа теряют ДНК-синтетическую активность (рис. 14, В, б).

Анализ митотической активности после окраски клеток АТ к Н3-фосфогистону подтвердил пролиферативную активность клеток ЦЭ при культивировании на Лм (рис. 15) — через 12 ч после посева выявляли отдельные клетки, а через 5 и 21 сут после посева были выявлены окрашенные малые клетки в колонии-подобных агрегатах, прикрепленные к ЦЦ-подобным клеткам.

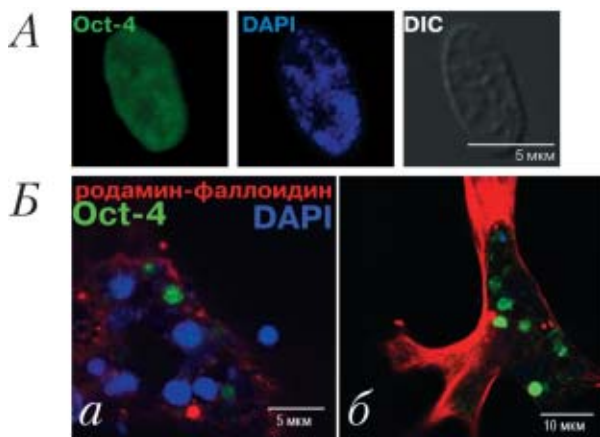


Рис. 16. Окраска клеток ЦЭ антителами к Oct-4: А — окраска суспензий клеток *in vivo*; Б — окраска клеток *in vitro*: а — 6 сут. культивирования; б — 15 сут культивирования

к транскрипционному фактору Oct-4 — маркеру стволовых клеток *in vivo* и *in vitro*. Антителами к Oct-4 окрашиваются малые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 16, А). При культивировании эти клетки окрашиваются в составе колонии-подобных агрегатов (рис. 16, Б). Поскольку Oct-4 у иглокожих не обнаружен, эти данные требуют дальнейших исследований.

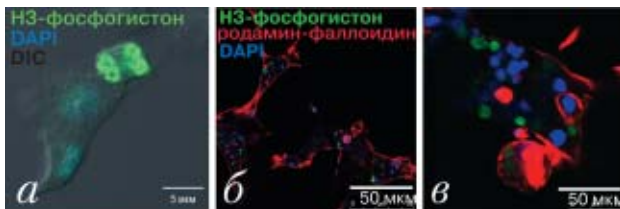


Рис. 15. Митотическая активность клеток ЦЭ при культивировании на ламинине после окраски АТ к Н3-фосфогистону (зеленый): а — клетки через 24 ч после посева; б — клетки через 5 сут культивирования; в — клетки ЦЭ через 21 сут культивирования. Красный — родамин-фаллоидин, синий — DAPI

Таким образом, оба типа малых ЭЦ, выявленные ранее *in vivo*, сохраняют свою пролиферативную активность при культивировании на Лм, причем демонстрируют различный пролиферативный потенциал — прикрепленные к Лм клетки проявляют более высокую способность к делению в течение длительного времени. По-видимому, эти клетки имеют другое сродство к Лм, что свидетельствует об ином, по сравнению с прикрепленными клетками, наборе поверхностных рецепторов.

Окраска клеток АТ

к транскрипционному фактору Oct-4 — маркеру стволовых клеток *in vivo* и *in vitro*. Антителами к Oct-4 окрашиваются малые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением (рис. 16, А). При культивировании эти клетки окрашиваются в составе колонии-подобных агрегатов (рис. 16, Б). Поскольку Oct-4 у иглокожих не обнаружен, эти данные требуют дальнейших исследований.

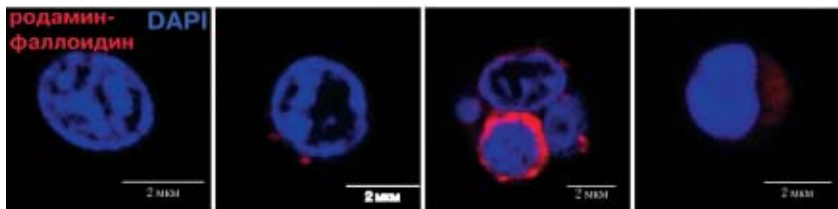


Рис. 17. Демонстрация переходных форм клеток от клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением до клеток с полярным распределением F-актина. Окраска родамин-фаллоидином (красный) и DAPI (синий)

Возможность дифференцировки малых клеток в клетки других типов. Принято считать, что клетки ЦЖ являются клетками одной линии, однако этот вопрос остается открытым. В настоящее время надежных маркеров дифференцировки для клеток морских беспозвоночных не существует. Авторы опираются на изменение соотношения диаметра ядра к диаметру цитоплазмы клеток (Johansson et al., 2000; Soderhall et al., 2003 и др.). На основе морфометрического анализа клеток после прикрепления к различным подложкам, мы проследили возможные переходные формы от клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением к клеткам с полярным распределением F-актина. Переходные формы представлены на рис. 17.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе исследован состав популяций клеток ЦЖ и ЦЭ морской звезды *A. rubens*, предложена собственная классификация клеток, причем состав суспензий клеток ЦЭ охарактеризован впервые. Выявлены типы клеток, которые занимают пограничное положение между ЦЭ и целомической полостью. Это крупные агранулоциты и гранулоциты и малые клетки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением, характеризующиеся дискретно окрашенным ядром (1-го типа). Выявлены значительные изменения доли этих клеток в составе ЦЭ и ЦЖ, вызванные травмированием. Обнаружена новая субпопуляция клеток ЦЭ, слабо связанных с ЦЭ, обогащенная малыми эпителиальными клетками 1 типа, в которой доля этих клеток достигает 50%. Показана возможность миграции малых клеток 1 типа из состава ЦЭ в ЦЖ. Эти данные позволяют предположить, что, помимо «зрелых» ЦЦ, выходящих из состава ЦЭ в целомическую полость после травмирования, для восполнения пула ЦЦ, предшественниками ЦЦ также могут являться клетки без выраженных признаков цитодифференцировки с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением.

Анализ локализации малых клеток в составе ЦЭ, проведенный в случайно выбранных фрагментах эпителия, выявил несколько позиций: в соединительной ткани ЦЭ, в составе ЦЭ, не содержащего жгутиковых клеток, а также как большие скопления клеток в участках эпителия, обедненных жгутиковыми клетками. Эти данные показали необходимость более детального исследования всей поверхности луча звезды, устланного ЦЭ, для уточнения локализации малых клеток на поверхности ЦЭ другими методами.

Иммунофлюоресцентный анализ показал, что только незначительная часть малых клеток характеризуется ДНК-синтетической и митотической активностью.

Эти данные подтверждаются результатами, полученными с помощью метода проточной цитометрии, который демонстрирует, что часть популяции малых ЭЦ в составе новой субпопуляции ЦЭ находятся на G2 стадии клеточного цикла. Следовательно, часть популяции малых ЭЦ способна к пролиферации, а значительный пул клеток готов к выходу в целомическую полость и дальнейшей дифференцировке. Таким образом, создана методическая основа для исследования клеточного цикла суспензий клеток ЦЭ.

Анализ клеток ЦЖ и ЦЭ при культивировании *in vitro* с помощью маркеров ДНК-синтетической и митотической активности показал сохранение нестимулированной пролиферативной активности клеток ЦЭ в течение длительного времени (до двух месяцев), тогда как в работах других авторов максимальный срок деления в условиях культуры не превышает 10–14 дней. Важным результатом, создающим основы для культивирования и анализа клеток *in vitro* является факт обогащения популяции клеток малыми клетками при посадке клеток на ламинин и увеличение доли пролиферирующих клеток по сравнению с *in vivo*.

Способность окрашиваться АТ к транскрипционному фактору, маркеру стволовых клеток, Oct-4, проявляющаяся у малых ЭЦ *in vivo* и при культивировании можно рассматривать только как предварительный результат, так как ген *oct-4* у иглокожих не выявлен.

В вопросе о возможных путях дифференцировки малых клеток сделаны только первые шаги на уровне анализа морфологии клеток.

ВЫВОДЫ

1. ДНК-синтетической и митотической активностью характеризуются 2 типа малых эпителиальных клеток с высоким ядерно-цитоплазматическим отношением – клетки диаметром 4 мкм с дискретным распределением хроматина (малые эпителиоциты 1 типа), и клетки диаметром 2–3 мкм с конденсированным хроматином (малые эпителиоциты 2 типа). Часть популяции малых клеток находится в G2 стадии клеточного цикла.

2. Малые эпителиоциты 1 типа обнаружены как в составе популяций ЦЦ, так и в составе популяций клеток ЦЭ. Обнаружена новая субпопуляция клеток ЦЭ, обогащенная малыми эпителиальными клетками 1 типа, доля этих клеток достигает 50 %. Доля этих клеток изменяется в ответ на травмирование. Клетки этого типа способны выходить в целомическую полость из состава ЦЭ.

3. Малые эпителиоциты 1 типа локализируются в соединительной ткани ЦЭ, в составе ЦЭ, не содержащего жгутиковых клеток, а также как большие скопления клеток в участках эпителия, обедненных жгутиковыми клетками.

4. Выявлено обогащение популяции клеток ЦЭ малыми клетками при посадке на ламинин. При культивировании клеток ЦЭ на ламинине наблюдается сохранение пролиферативной активности в течение длительного времени.

5. Морфологические характеристики малых ЭЦ, пролиферативная активность, способность к миграции, поведение в культуре, сродство к ламинину, а также способность окрашиваться АТ к транскрипционному фактору, маркеру стволовых клеток, Oct-4 свидетельствуют о том, что малые ЭЦ проявляют свойства стволовых клеток.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Шарлаимова Н.С., Пинаев Г.П., Петухова О.А. Сравнительный анализ поведения и пролиферативной активности в культуре клеток целомической жидкости и клеток различных тканей морской звезды *Asterias rubens* L. полученных из нормальных травмированных животных // Цитология, 2010, Т. 52 (4), С. 317–325.

Шарлаимова Н.С., Петухова О.А. Характеристика популяций клеток целомической жидкости и целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L., способных прикрепляться и распластываться на различных субстратах // Цитология, 2011, Т. 53 (11), С. 891–902.

Шарлаимова Н.С., Петухова О.А., Пинаев Г.П. Клетки целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L. в культуре как тест на функциональное состояние ткани целомического эпителия после ранения // Международная конференция «Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия», 25–27 октября 2004 г. С. 948–949.

Шарлаимова Н.С., Петухова О.А., Пинаев Г.П. Оценка пролиферативной активности клеток в тканях *Asterias rubens* L. на ранних сроках регенерации // Всероссийский симпозиум «Биология клетки в культуре», Санкт-Петербург, 17–19 октября 2006 г. С. 810.

Шарлаимова Н.С., Петухова О.А., Пинаев Г.П. Анализ адгезивных свойств клеток целомической жидкости морской звезды *Asterias rubens* L. На ранних сроках заживления раны // VIII научная сессия Морской Биологической Станции Санкт-Петербургского Университета, Санкт-Петербург, 8 февраля 2007 г. С. 93–94.

Шарлаимова Н.С. Морфо-функциональный анализ популяции клеток целомической жидкости и тканей морской звезды *Asterias rubens* L. на ранних сроках регенерации // Двенадцатая Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов, 29 ноября 2007, С. 45.

Шарлаимова Н.С., Петухова О.А. Анализ адгезивных свойств клеток целомической жидкости и целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L. На ранних сроках заживления раны // IX научная сессия Морской Биологической Станции Санкт-Петербургского Университета, 8 февраля 2008 г. С. 78–80.

Шарлаимова Н.С. Морфофункциональный анализ клеток целомической жидкости и целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L. в условиях первичной культуры // Тринадцатая Санкт-Петербургская ассамблея молодых ученых и специалистов, 15 декабря 2008 г., С. 50.

Шарлаимова Н.С., Петухова О.А. Культивирование клеток целомической жидкости и целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L., выделенных на ранних сроках после нанесения раны // Школа-конференция для молодых ученых «Методы культивирования клеток». Санкт-Петербург, 6 октября 2008 г. С. 831.

Шарлаимова Н.С., Петухова О.А. Характеристика субпопуляции клеток, слабо связанных с целомическим эпителием морской звезды *Asterias rubens* L. при культивировании на ламинине. // Всероссийский симпозиум по биологии клетки в культуре «Культивируемые клетки как основа клеточных технологий», Санкт-Петербург, 12–14 октября 2009 г. С. 793–794.

Шарлаимова Н.С., Петухова О.А. Характеристика субпопуляции клеток целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L. // X научная сессия Морской Биологической станции СПбГУ. Санкт-Петербург, 9 февраля 2009 г. С. 69

Шарлаимова Н.С., Петухова О.А. Морфофункциональная характеристика новой субпопуляции клеток целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L. // III Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2010». Нижний Новгород, 24–28 мая, 2010 г. С. 157–158.

Шарлаимова Н.С., Зенин В.В., Шабельников С.В., Петухова О.А. Субпопуляции клеток целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L., характеризующаяся высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением // XII научная сессия Морской Биологической Станции Санкт-Петербургского Университета. Санкт-Петербург, 4 февраля 2011 г. С. 80–81.

Шарлаимова Н.С., Петухова О.А. Пролиферирующие клетки целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L. *in vivo* и *in vitro* // IV Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз-Россия 2011». Воронеж, 23–27 мая, 2011. С. 218–220.

Петухова О.А., **Шарлаимова Н.С.**, Шабельников С.В. Гистологический анализ прогениторных клеток целомического эпителия морской звезды *Asterias rubens* L. // III Всероссийская конференция с международным участием и Школа для молодых специалистов и студентов «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» Санкт-Петербург, 17–19 октября 2011 г.

Список цитируемой литературы

- Горшков А.Н., Блинова М.И., Пинаев Г.П. (2009). *Цитология*, **51(8)**: 650–662. Ермак А.В., Одицова Н.А. (1996). *Биология моря*, **22(6)**: 371–377. Исаева В.В., Ахмадиева А.В., Александрова Я.Н., Шукалюк А.И. (2009). *Онтогенез*, **40(2)**: 83–97. Исаева В.В., Коренбаум Е.С. (1989). *Биология моря*, **6**: 3–14. Козлова А.Б., Петухова О.А., Пинаев Г.П. (2006) *Цитология*, **48(3)**: 175–183. Коренбаум Е.С., Воробьев В.А. (1988). *Биология моря*, **1**: 27–33. Одицова Н.А. (2006). *Цитология*, **51(4)**: 367–372. Черепанова О.А., Калмыкова Н.В., Воронкина И.В., Арз А.Ф., Горелик Ю.В., Пинаев Г.П. (2002). *Цитология*, **44(2)**: 151–158. Candia Carnevali M.D., Bonasoro F. (2001a). *Microsc Res Tech*, **55(6)**: 365–8. Candia–Carnevali M.D. (2006). *ISJ*, **3**: 64–76. Cobb J.L. (1978). *Cell Tiss. Res*, **187**: 515–523. Hendzel M. J., Yi Wei, Mancini M.A., Van Hooser A., Ranalli T., Brinkley B.R., Bazett–Jones D.P., Allis C. D. (1997). *Chromosoma* **106**: 348–360. Hertzler P.L., McClay D.R. (1999). *Dev Biol*, **207**: 1–13. Holm K., Dupont S., Skuld H., Stenius A., Thorndyke M. and Hernroth B. (2008). *Exp. Biol*, **211**: 2551–2558. Isaeva, V.V. (2011). In: *Embryonic Stem Cells – Basic Biology to Bioengineering*: 450–478. Kanungo K.T. (1982). *Biol. Bull.* **163**: 438–452. Katow H.(1986). *Exp Cell Res*, **162**: 401–410. Morgan T.H. (1901) . *Regeneration*, P.: 348. Moss C., Hunter A.J., Thorndyke M.C. (1998). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **353**: 421–436. Naganuma T., Degnan B.M., Horikoshi K., Morse D.E. (1994). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol*, **3(3)**: 131–40. Odintsova N.A., Khomenko A.V. (1993). *Cytotechnology*, **6**: 49–54 . Patruno M., Thorndyke M.C., Candia Carnevali M.D., Bonasoro F., Beesley P. (2001) *Mar Biotechnol (NY)*, **3(1)**: 4–15. Pinsino A, Thorndyke MC, Matranga V. (2007). *Cell Stress Chaperones*, **12(4)**: 331–41. Schoenmakers H.J.N., Colenbrander P.H.J.M., Peute J., and van Oordt P.G.W.J. (1981). *Cell Tissue Res*, **217**: 577–597. Sea Urchin Genome Sequencing Consortium. (2006). *Stem Cells In Marine Organisms*. [Ed.] Rinkevich, Matranga (2009) *SpringerLink*. London. 367 P. Thorndyke M.C., Patruno M., Chen W.C., Beesley P.W. (2001). *Symp Soc Exp Biol*, **53**: 107–20. Vanden Bossche J.P., JanGoux M. (1976). *Nature*, **261**: 227–228. Winer B.J., Brown D.R., Michels K.M. (1991). *New York: McGraw–Hill*. 399 P.

Автор выражает искреннюю благодарность Отделу клеточных культур Института цитологии, а в особенности научному руководителю О.А. Петуховой, заведующему Отделом клеточных культур Г.П. Пинаеву, М.И. Блиновой, И.В. Воронкиной,

а также всем, кто принимал участие в экспедициях — С.В. Шабельникову, Н.А. Шубину, Д.Е. Бобкову. Автор выражает благодарность руководству и сотрудникам ББС ЗИН РАН, мыс Картеш. Отдельную благодарность автор выражает сотрудникам Отдела клеточных культур — Т.Н. Ефремовой, А.М. Кольцовой, Е.С. Божжиной и О.А. Цапфиной

Подписано в печать 15.12.2011. Формат 60×88 ¹/₁₆

Бумага офсетная.

Усл.-печ. л. 1,5

Тираж 100 экз. Заказ № 4388

Отпечатано в соответствии с предоставленными материалами
в ООО «Студия «НП-Принт», 190005, Россия, Санкт-Петербург, Измайловский пр., дом 29
<http://www.npprint.com/>

