РОЛЬ НЕЙРОАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ПРОЦЕССАХ РАЗВИТИЯ СТРЕКАЮЩИХ *AURELIA AURITA* (SCYPHOZOA) И *GONOTHYRAEA LOVENI* (HYDROZOA) И ИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ НА СТАДИЯХ РАННЕГО ОНТОГЕНЕЗА

Т. Д. Орлова, И. А. Косевич

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, г. Москва, Россия
e-mail: planyla@gmail.com, ikos@mail.ru

Введение

Большинство представителей Cnidaria, относящиеся к классам Scyphozoa и Hydrozoa, имеют сложный жизненный цикл с чередующимися жизненными формами: медузоидной и полипоидной, которые характеризуются половым и бесполым размножением, соответственно (Fautin, 1999). Период раннего онтогенеза включает эмбриогенез, существование личиночной формы и стадии метаморфоза личинки.

Для Cnidaria характерно наружное или наружно-внутреннее оплодотворение, которое происходит в гастральной полости или в гонофорах (Fautin, 1999). Дробление зиготы вариабельно, но в результате формируется полая целобластула или цельная стереобластула. Способы гаструляции также варьируют: это может быть инвагинация, уни- и мультиполярные ингрессия, деламинация или эпиболия. Во время гаструляции запускаются процессы клеточной дифференцировки. Постепенно происходит превращение эмбриона в свободно плавающую личиночную стадию – планулу (Yuan et al., 2008). При этом эмбрион вытягивается вдоль антерио-постериорной оси, поэтому ранние стадии округлые, более поздние – удлиненные. Стадия планулы начинается тогда, когда организм может однонаправлено передвигаться (Yuan et al., 2008).

Планула равномерно покрыта ресничками и имеет цилиндрическую форму. Перед началом метаморфоза планула принимает булавовидную форму и плавает расширенным концом вперед (Martin and Chla, 1982; Martin et al., 1983). Личинка оседает на подходящий субстрат передним расширенным концом и претерпевает метаморфоз. При этом она укорачивается и приобретает округлую форму. Затем животное вновь начинает удлиняться. Оральная часть поднимается над субстратом и трансформируется в первичного полипа. Аборальная часть остаётся прикреплённой к субстрату и формирует подошву полипа. Так дифференцируется первичный полип и начинается полипоидная фаза жизненного цикла (Martin et al., 1983).

Особенный интерес представляет тот факт, что каждая стадия развития характеризуется своим специфическим пространственным паттерном клеток с нейроактивными веществами. При переходе к последующей стадии нейрональная система предыдущей стадии часто полностью утрачивается.

К настоящему времени информации о распределении и функциях нейроактивных веществ в эмбриональных клетках сцифоидных и гидроидных накоплено очень мало. Однако есть данные, полученные на эмбрионах других беспозвоночных. Считается, что холинэргические, адренэргические и серотонинэргические системы представлены на ранних эмбриональных стадиях всех позвоночных и беспозвоночных животных. У морского ёжа и дрозофилы антагонисты серотонина блокируют первое деление дробления и морфогенетические движения клеток во время гаструляции. У ранних эмбрионов *Tritonia diomedea* (Mollusca, Nudibranchia) начиная с зиготы и до 8-клеточной стадии серотонин обнаруживается в области цитоплазмы, близкой к анимальному полюсу. На стадиях морулы и бластулы метка к серотонину проявляется в группе микромеров на анимальном полюсе (Buznikov and Shmukler, 1981; Buznikov et al., 2003).

Нейрональная организация личинок стрекающих изучено намного подробнее. У личинок Cnidaria нейроактивные вещества концентрируются в клетках эктодермы антериорного полюса тела (Nakanishi et al., 2008). Личинка *Aurelia aurita*, как и большинство планул других стрека-

ющих, имеет эктодермальную нервную систему, состоящую из нескольких типов нейронов. Это «апикальные нейроны» – клетки в апикальном органе, расположенном на антериорном полюсе тела личинки; «латеральные нейроны» – клетки, расположенные с интервалом через 3–5 клеток в боковой эктодерме и содержащие нейроактивные вещества. Аксоны нейронов апикального органа образуют сплетение в основании апикального органа и тянутся вдоль мезоглеи к постериорному (оральному) концу личинки (Nakanishi et al., 2008). Нейроны и их аксоны содержат различные нейроактивные вещества, такие как LW-, RF- и FMRF-амиды, серотонин, таурин, дофамин, γ-аминомасляную кислоту, тирозинированный тубулин и пр. (Katsukura et al., 2004; Kass-Simon and Pierobon, 2007; Nakanishi et al., 2008).

Апикальный орган играет важную роль в процессе оседания планулы. Возможно, сенсорные клетки апикального органа несут на внешней мембране химические структуры, необходимые для инициации прикрепления и/или метаморфоза (Yuan et al., 2008). Интересно, что при введении в среду экзогенных веществ из числа перечисленных выше, поведение личинок изменяется. На планулах *Hydractinia echinata* (Hydrozoa) было показано, что внесение в среду LW-амида ускоряет движения личинок в поисках субстрата для оседания. Добавление RF-амид делает движения планул более медленными и непродолжительными. В высоких концентрациях LW-амид стимулирует, а RF-амид ингибирует метаморфоз планул указанного вида (Katsukura et al., 2004). Внесение серотонина стимулирует метаморфоз у планул гидроидных *Eudendrium racemosum* и *Phialidium gregarium* (Zega et al., 2007).

В ходе оседания и метаморфоза происходят морфологические изменения клеток и всего тела планулы. Судьба личиночных клеток варьирует: некоторые дегенерируют и не восстанавливаются, другие могут оставаться неизменными на взрослой стадии, и, наконец, некоторые могут подвергаться морфологическим изменениям при дальнейшем развитии. Предполагается, что сенсорные клетки воспринимают сигналы, инициирующие прикрепление и метаморфоз, и через нервное сплетение передают эту информацию другим клеткам планулы. Как только включается триггер метаморфоза в соседних клетках, сенсорные клетки дегенерируют (Martin et al., 1983). Это подтверждают иммуногистохимические исследования, проведенные при помощи антител к FMRF-амиду на *A.aurita*. В процессе превращения в полип экспрессия FMRF-амида в эктодерме планулы понижается, переходит в эндодерму и там исчезает, что, скорее всего, связано с апоптозом FMRF-амид-содержащих клеток. Антериорный (аборальный) тип концентрации эктодермальных нейронов, свойственный планулам, полностью дегенерирует и «вторичная» нервная система, в которой нейроны располагается на постериорном (оральном) конце полипа, развивается *de novo*. Это свойственно и гидроидным (Nakanishi et al., 2008).

Целью настоящей работы было выявить распределение клеток, содержащих различные нейроактивные вещества, на стадиях раннего онтогенеза *Aurelia aurita* и *Gonothyraea loveni*.

Материалы и методы

Объектами исследования были выбраны эмбрионы, планулы и первичные полипы *Aurelia aurita* и *Gonothyraea loveni*.

Материал по *A.aurita* был собран в августе 2008–2009 годов на Беломорской биостанции им. Н. А. Перцова МГУ им. М. В. Ломоносова. Из моря вылавливали самок медуз *A.aurita* и извлекали из карманов ротовых лопастей эмбрионы и планулы. Далее за их развитием наблюдали в лаборатории при 18 °C.

Эмбрионы и планулы *G.loveni* были собраны в июне-июле 2009 года на ББС МГУ. Их извлекали из медузоидов женских колоний и содержали при 18 °C для изучения дальнейшего развития.

Животных на разных стадиях развития фиксировали 4% параформальдегидом на фосфатном буфере (pH 7,4).

Для выявления серотонина, FMRF-амида и тубулина использовали метод иммуноцитохимии как наиболее удобный и отвечающий требованиям поставленной цели. Окраску антителами проводили согласно стандартному протоколу. Визуализацию результатов осуществляли при помощи лазерного конфокального микроскопа Leica TCS SPE с объективами x10, x40 и x63.

Результаты и обсуждение

Иммуноцитохимическое исследование эмбрионов *A.aurita* и *G.loveni* на наличие серотонина показало, что нейротрансмиттер содержится почти во всех бластомерах дробящихся эмбрионов обоих видов (рис. 1). Интересно, что в данном случае наблюдается крупно-гранулярное окрашивание, что может говорить в пользу содержания серотонина в желточных гранулах, которыми наполнены клетки эмбрионов. Это

предположение соответствует данным, полученным на дробящихся эмбрионах многощетинкового червя *Ophryotrocha labronica*. Так, на *O.labronica* авторадиографическим методом было показано, что синтез и накопление серотонина происходит именно в желточных гранулах. Возможно, серотонин постепенно выделяется из желточных гранул и взаимодействует с микрофиламентами. Таким образом контролируется сократительная активность клеток эмбриона и деления дробления (Emanuelsson, 1974). Локализация вновь синтезированного серотонина во внутриклеточных желточных гранулах показывает, что это продукт активности материнских генов (Emanuelsson et al., 1988).

FMRF-амид не был выявлен нами в дробящихся эмбрионах *A.aurita* и *G.loveni*.

У планул *A.aurita* и *G.loveni* метки к серотонину включаются в клетки апикального органа, а также отдельные эктодермальные клетки (рис. 2). Присутствие серотонина в апикальном органе планул было также показано у гидроидных *Phialidium gregarium* (McCauley, 1997), *Hydractinia echinata*, *Eudendrium racemosum* (Zega et al., 2007). На снимках видно, что окрашивание имеет мелко-гранулярную структуру. Это может свидетельствовать о том, что серотонин содержится внутри везикул, характерных для нервных клеток стрекающих (Grimmelikhuijzen et al., 2002).

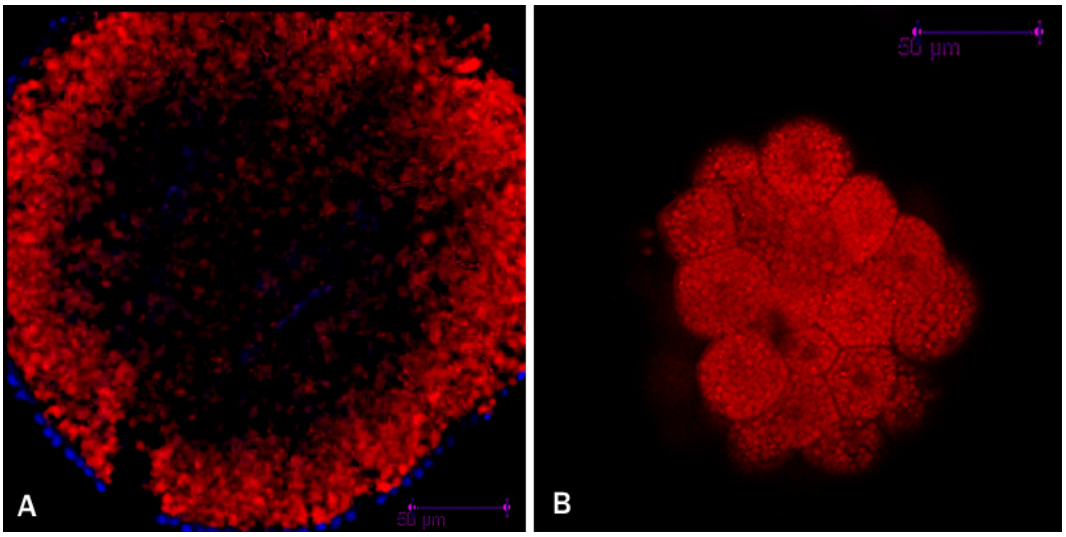

Рис. 1. **Распределение серотонина (красный цвет) на эмбриональных стадиях *A.aurita* (A) и *G.loveni* (B). Синим цветом окрашены ядра**

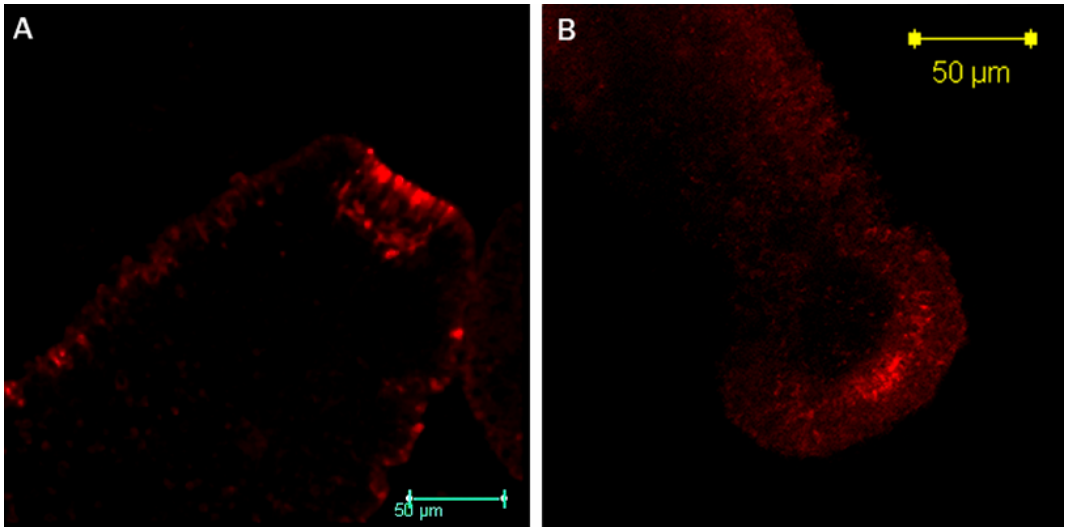

Рис. 2. **Антериорные полюса зрелых планул *A.aurita* (A) и *G.loveni* (B). Окрашивание антителами против серотонина (красный цвет)**

Стоит отметить, что иммуноцитохимическими методами серотонин выявляется уже у молодых планул (препланул) *A.aurita* (рис. 3), в то время как у *G.loveni* положительная реакция наблюдается только у планул, компетентных к метаморфозу: до этого момента серотонин в клетках личинок *G.loveni* не обнаруживается. Это может указывать на более узкий спектр процессов, происходящих у *G.loveni* с участием серотонина, и касающихся только инициации метаморфоза. У *A.aurita* серотонин, скорее всего, связан также с другими функциями в организме, что может объяснить его регистрацию в клетках апикального органа препланул. Возможно также, что у *A.aurita* синтез серотонина, необходимого в момент инициации метаморфоза, начинается раньше, уже у молодой планулы. А у *G.loveni* синтез начинается непосредственно перед началом периода компетентности к метаморфозу. Этот факт подчеркивает различный вклад серотонина в процесс метаморфоза у представителей двух разных групп стрекающих.

Пространственно-временные паттерны FMRF-амида, напротив, схожи у *A.aurita* и *G.loveni*. Этот нейропептид выявлен в виде мелко-гранулярного окрашивания в апикальной цитоплазме клеток апикального органа (рис. 4). Апикальный орган, как сенсорная структура планул, отвечает за восприятие внешних химических сигналов, в том числе инициирующих процессы метаморфоза (Nakanishi et al., 2008). Следовательно, FMRF-амид, как и серотонин, может опосредовать проведение подобных сигналов, обеспечивая межклеточную передачу информации.

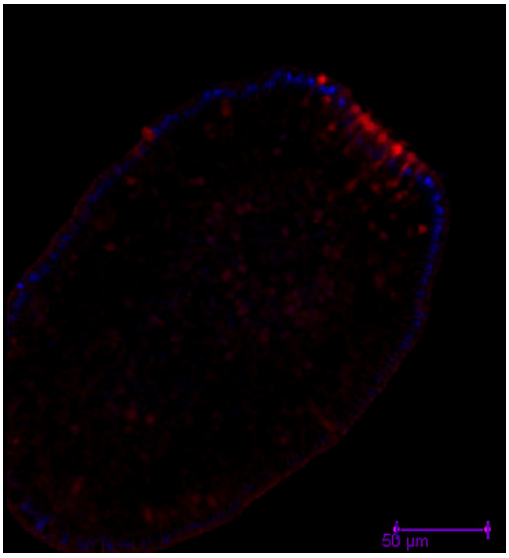

Рис. 3. **Препланула *A.aurita* . Иммуноцитохимическое окрашивание антителами против серотонина (красный цвет). Синим цветом окрашены ядра**

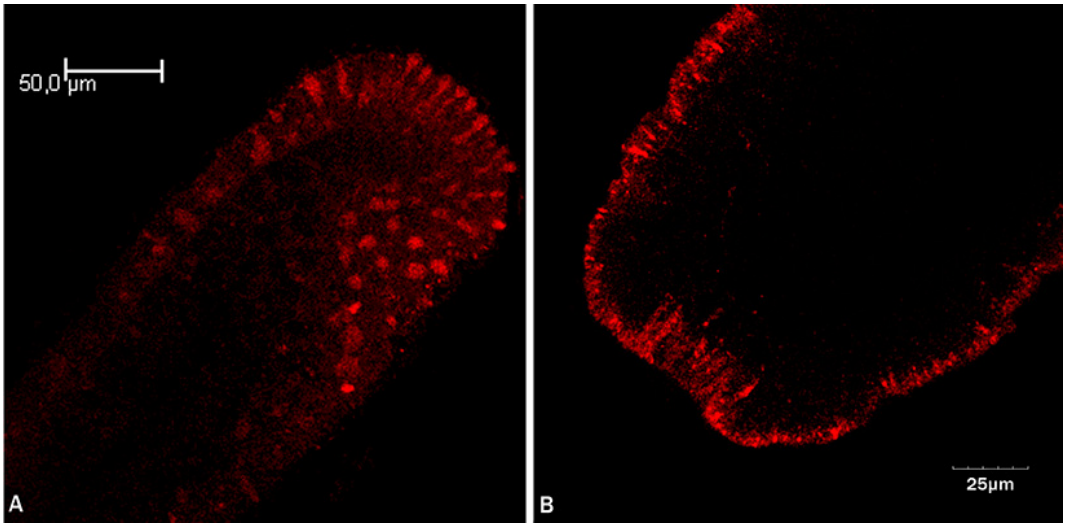

Рис. 4. **Антериорные полюса зрелых планул *G.loveni* (A) и *A.aurita* (B), иммуноцитохимическое окрашивание на FMRF-амид (красный цвет)**

Ранее при исследованиях планул *A.aurita* было выявлено иммунологическое включение метки к FMRF-амиду в область апикального органа (Nakanishi et al., 2008). Для *G.loveni* изучение паттерна нейроактивных веществ было проведено впервые, также впервые установлено наличие серотонина у *A.aurita*. Однако в отличие от проведенных ранее исследований нами не были выявлены отростки нервных клеток – аксоны, – содержащие серотонин или FMRF-амид. Подобные структуры в области мезоглеи наблюдались лишь у *G.loveni* при использовании антител про-

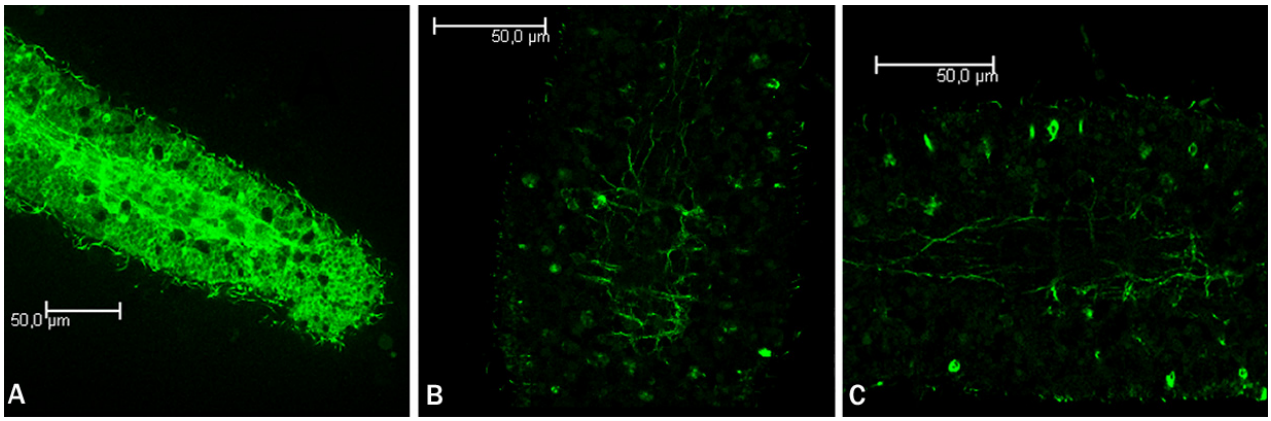

Рис. 5. **Окрашивание антителами против тирозинированного тубулина (зеленый цвет) зрелых планул *G.loveni*. А – антериорная половина тела; B, C – средняя часть тела, два оптических среза на разном расстоянии от поверхности**

тив тирозинированного тубулина (рис. 5), который предположительно является нейральным маркером (Gröger and Schmid, 2001; Voronezhskaya et al., 2002). Клетки, дающее положительное окрашивание на тирозинированный тубулин, к настоящему моменту мало изучены, однако, есть данные, согласно которым некоторые из этих клеток содержат также и серотонин. При этом нейросенсорную функцию приписывают именно клеткам с колокализацией серотонина и тирозинированного тубулина (Zega et al, 2007). У гидроидного *Podocoryne carnea* тирозинированный тубулин появляется в клетках позже других нейроактивных веществ. Сначала аксоны, содержащие тирозинированный тубулин, располагаются перпендикулярно антерио-постериорной оси и формируют кольца в антериорной части личинки. Затем появляются аксоны, идущие спереди назад, к моменту метаморфоза их количество увеличивается. Иммуноположительные аксоны находятся на базальной стороне эктодермы (Gröger and Schmid, 2001). На полученных снимках мы, как правило, наблюдали продольные, параллельно идущие волокна в области мезоглеи, поперечное расположение встречалось значительно реже. Колокализация тирозинированного тубулина с серотонином или FMRF-амидом у *G.loveni* не выявлена. При помощи подобной нервной сети могут передаваться сигналы о сокращении мышечных волокон, так как в некоторых местах миофибриллы могут располагаться точно над аксоном, образуя, таким образом, нейроэпителиомышечный контакт (Nakanishi et al., 2008). После начала метаморфоза личинки обоих стрекающих более не включают метки к нейроактивным веществам, по мере прикрепления окрашивание в области подошвы (бывший апикальный орган) быстро пропадает. По-видимому, в период метаморфоза ларвальная нервная система полностью дегенерирует, нервные клетки уходят в апоптоз, как это было показано на *A.aurita* (Nakanishi et al., 2008). Это объясняется сменой жизненной формы со свободно плавающей личинки на жизненную форму прикрепленного полипа. В последнем случае сенсорные клетки не так необходимы, как для активно плавающей формы, которая должна определять направление оптимального перемещения в пространстве. Следовательно, после того, как процесс метаморфоза запущен, нейроактивные вещества теряют свою функциональную нагрузку, и клетки, содержащие их, гибнут.

Заключение

В ходе исследования паттерна нейроактивных веществ на стадиях раннего онтогенеза *Aurelia aurita* (Scyphozoa) и *Gonothyraea loveni* (Hydrozoa) были выявлены как сходства, так и различия между этими представителями двух классов стрекающих. Так, на стадии дробления серотонин содержится в бластомерах эмбрионов обоих видов, а FMRF-амид отсутствует. На этой стадии развития серотонин связан, скорее всего, с контролем процессов дробления и формирование зародыша. Серотонин и FMRF-амид выявлены в клетках апикального органа планул *A.aurita* и *G.loveni*. Как было показано, эти вещества опосредуют сигналы о метаморфозе у многих изученных представителей типа Cnidaria, следовательно, они могут выполнять эту функцию и у рассматриваемых видов. У планул *G.loveni* выявлена нервная сеть, состоящая из продольных и поперечных волокон, идущих в области мезоглеи и включающих метку к

тирозинированному тубулину. Благодаря этой нервной сети клетки личинки могут получать сигналы, идущие от сенсорных клеток апикального органа. После вступления в метаморфоз и при формировании полипоидной стадии исследованные нейроактивные вещества более не выявляются у обоих видов, что свидетельствует о катастрофической перестройки нервной системы, при которой ларвальный тип нервной системы полностью деградирует.

Таким образом, мы видим довольно схожую картину пространственно временных паттернов нейроактивных веществ у *Aurelia aurita* и *Gonothyraea loveni*, что может подтверждать предположения о высоко консервативных механизмах развития внутри типа Cnidaria.

Исследования были выполнены при поддержке Министерства образования и науки РФ и Совета по грантам Президента РФ.

Литература

Buznikov G. A., Shmukler Yu. B. Possible role of «prenervous» neurotransmitters in cellular interactions of early embryogenesis: a hypothesis // Neurochem. Res. 1981. V. 6. P. 55–68.

Buznikov G.A., Nikitina L.A., Voronezhskaya E.E., Bezuglov V.V., Willows A.O.D., Nezlin L.P. Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia) // Cell Tissue Res. 2003. V. 311. P. 259–266.

Emanuelsson H. Localization of serotonin in cleavage embryos of Ophryotrocha Labronica La Greca and Bacci // Wilhelm Roux' Archiv. 1974. V. 175. P. 253–271.

Emanuelsson H., Carlberg M., Löwkvist B. Presence of serotonin in early chick embryos // Cell Differentiation. 1988. V. 24. P. 191–200.

Fautin D.G. Cnidaria // Encyclopedia of Reproduction. 1999. V. 1. P. 645–652.

Grimmelikhuijzen C.J.P, Williamson M., Hansen G.N. Neuropeptides in cnidarians // Can. J. Zool. 2002. V. 80(10). P. 1690–1702.

Gröger H., Schmid V. Larval development in Cnidaria: a connection to Bilateria? // Genesis. 2001. V. 29. P. 110–114.

Kass-Simon G., Pierobon P. Cnidarian chemical neurotransmission, an updated overview // Comp. Biochem. Physiol., A. 2007. V. 146. P. 9–25.

Katsukura Y., Ando H., David Ch.N., Grimmelikhuijzen C.J.P., Sugiyama T. Control of planula migration by LWamide and RFamide neuropeptides in *Hydractinia echinata* // J. Exp. Zool. 2004. V. 207. P. 1803–1810.

Martin V., Chia F., Koss R. A fine structural study of metamorphosis of the hydrozoan *Mitrocomella polydiademata* // Journal Of Morphology. 1983. V. 176. P. 261–287.

Martin V.J and Chia F. Fine structure of a scyphozoan planula, *Cassiopeia xamachana* // BioL Bull. 1982. V. 163. P. 320–328.

McCauley D.W. Serotonin plays an early role in the metamorphosis of the hydrozoan *Phialidium gregarium* // Developmental Biology. 1997. V. 190. P. 229–240.

Nakanishi N., Yuan D., Jacobs D.K., Hartenstein V. Early development, pattern, and reorganization of the planula nervous system in *Aurelia* (Cnidaria, Scyphozoa) // Dev. Genes Evol. 2008. V. 218. P. 511–524.

Voronezhskaya E.E., Tyurin S.A., Nezlin L.P. Neuronal development in larval chiton *Ischnochiton hakodadensis* (Mollusca: Polyplacophora) // J. comp. neurol. 2002. V. 444. P. 25–38

Yuan D., Nakanishi N., Jacobs D.K. Hartenstein V. Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia* // Dev. Genes Evol. 2008. V. 218. P. 525–539.

Zega G., Pennati R., Fanzago A., De Bernardi F. Serotonin involvement in the metamorphosis of the hydroid *Eudendrium racemosum* // Int. J. Dev. Biol. 2007. V. 51. P. 307–313.

THE ROLE OF NEUROACTIVE SUBSTANCES DURING THE DEVELOPMENT OF CNIDARIA (*AURELIA AURITA* (SCYPHOZOA) AND *GONOTHYRAEA LOVENI* (HYDROZOA)) AND THEIR SPATIAL DISTRIBUTION IN EARLY ONTOGENESIS STAGES

T.D. Orlova, I.A. Kosevich

Moscow State University, Moscow, Russia,
e-mail: planyla@gmail.com, ikos@mail.ru

We investigated the distribution of neuroactive substances during the early ontogenetic stages of *Aurelia aurita* and *Gonothyraea loveni*, namely the cleaving embryos, early planulae, mature planulae, metamorphic stages and young polyps. Antibodies were used to detect neurosubstances, and LCM to visualize the results. In embryos of both species, almost all blastomers contain serotonin in yolk granules. Early planula of *A.aurita* already possessed serotonin at the aboral pole of larva in the cells of

apical organ, known as a sensory structure. *Gonothyraea loveni* did not show serotonin at the same developmental stage even in the apical organ. Mature planulae of both species contain serotonin and FMRF-amide in their apical organs. Therefore, for the first time in the course of development the FMRF-amide appears at the stage of mature planula. Serotonin and FMRF-amide are believed to play role as transmitters of the metamorphic signals. The tyrosinated tubulin antibodies allowed visualization of the network of nerve cells processes at the base of epiderm in *G.loveni*. Most of the nerve cell processes lie parallel to the long axis of larva and some other perpendicular to the long axis. In both representatives of cnidarians no neuroactive substances were detected after the onset of metamorphosis.

Hence, we can conclude that the similar spatio-temporal pattern of investigated neurosubstances characterizes the early stages of ontogenesis in *Aurelia aurita* and *Gonothyraea loveni*. It can imply the existence of conservative developmental mechanisms in Cnidarians involving serotonin and FMRF-amide pathways.