

КЛЕТОЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И ПРОЛИФЕРАЦИЯ, МЕТАМОРФОЗ

УДК 593.73

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭМБРИОНАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ И МЕТАМОРФОЗА *AURELIA AURITA* (CNIDARIA, SCYPHOZOA)

© 2012 г. Т. Д. Майорова, И. А. Косевич, О. П. Мелехова

Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова

119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: ikosevich@gmail.com

Поступила в редакцию 27.05.11 г.

Окончательный вариант получен 12.01.12 г.

Aurelia aurita – космополитичный вид сцифомедузы, основные закономерности строения и жизненного цикла которого хорошо известны. В настоящей работе проведено подробное исследование развития и строения планулы *A. aurita* до завершения ее метаморфоза. Прижизненные наблюдения и изучение гистологического строения планул в процессе оседания и метаморфоза показали, что внутренняя выстилка манубриума первичного полипа (соответствующая гастродерме) происходит из эктодермального слоя заднего конца планулы. Впервые проведено изучение пространственной и временной динамики распределения серотонин-эргических клеток с начальных стадий развития зародыша до формирования первичного полипа. Также прослежено распределение тирозинированного тубулина и нейрпептида RF-амида на разных стадиях развития *A. aurita*.

Ключевые слова: онтогенез, метаморфоз, морфогенез, нервная система, сцифоидные, *Aurelia aurita*.

ВВЕДЕНИЕ

Стрекающие (Cnidaria) рассматриваются как двухслойные, радиально симметричные животные, занимающие в соответствии со своим базовым планом строения положение, близкое к предковым формам многоклеточных животных (Догель, 1981; Brusca et al., 2003). Данные молекулярно-филогенетических исследований подтверждают эту точку зрения, подчеркивая, что стрекающие представляют собой сестринскую группу по отношению к билатерально-симметричным животным внутри всех многоклеточных (Medina et al., 2001). Следовательно, понимание эволюции развития внутри стрекающих представляет собой огромный интерес для установления анцестрального варианта развития, послужившего основой для эволюции разнообразных типов развития билатеральных животных.

Благодаря такому интересу, в последние десятилетия были отработаны новые модельные системы, включающие одиночных и колониальных гидроидных (напр., *Hydra* (Bosch, 2003), *Hydractinia echinata* (Frank et al., 2001), *Podocoryne carnea* (Gröger and Schmid, 2001; Seipel and Schmid, 2005), *Clytia* (Carre et al., 2000) и др.), кубомедузу *Tripedalia cystophora* (Kozmik et al., 2008), актинию *Nematostella vectensis* (Fritzenwanker et al., 2002; Burton et al., 2004), кораллового полипа *Acropora millepora* (Miller et al., 1995; Miller and Ball, 2000a). Основное внимание при изучении раннего развития стрекающих направлено на выяснение механиз-

мов генетической регуляции установления полярности и первичной оси у многоклеточных. Однако, из-за большого разнообразия экспрессии гомологичных генов (Hobmayer et al., 2000; Miller et al., 2000b; Ball et al., 2004; Hayward et al., 2004; Chourrout et al., 2006), предковое состояние механизма установления первичной оси для всех стрекающих и билатерий до сих пор остается спорным. Следовательно, необходимы дополнительные молекулярно-филогенетические и сравнительно-анатомические данные по отдельным группам стрекающих, которые позволили бы увеличить информативность имеющихся филогенетических построений.

На данный момент к таким мало охваченным филогенетическими и сравнительно-анатомическими исследованиями группам стрекающих относятся сцифоидные (Scyphozoa). Даже для *Aurelia aurita*, одного из самых распространенных и хорошо известных представителей сцифоидных, раннее эмбриональное развитие и метаморфоз изучены достаточно поверхностно. Имеются лишь общие сведения о раннем эмбриональном развитии. Известно, что зародыши претерпевают полное равномерное дробление, в результате которого формируется целобластула. Стенки бластулы представлены высокими узкими клетками, бластоцель небольшого объема (Yuan et al., 2008). Гастрюляция осуществляется разнообразными способами: мультиполярной иммиграцией, инвагинацией или обоими способами одновременно

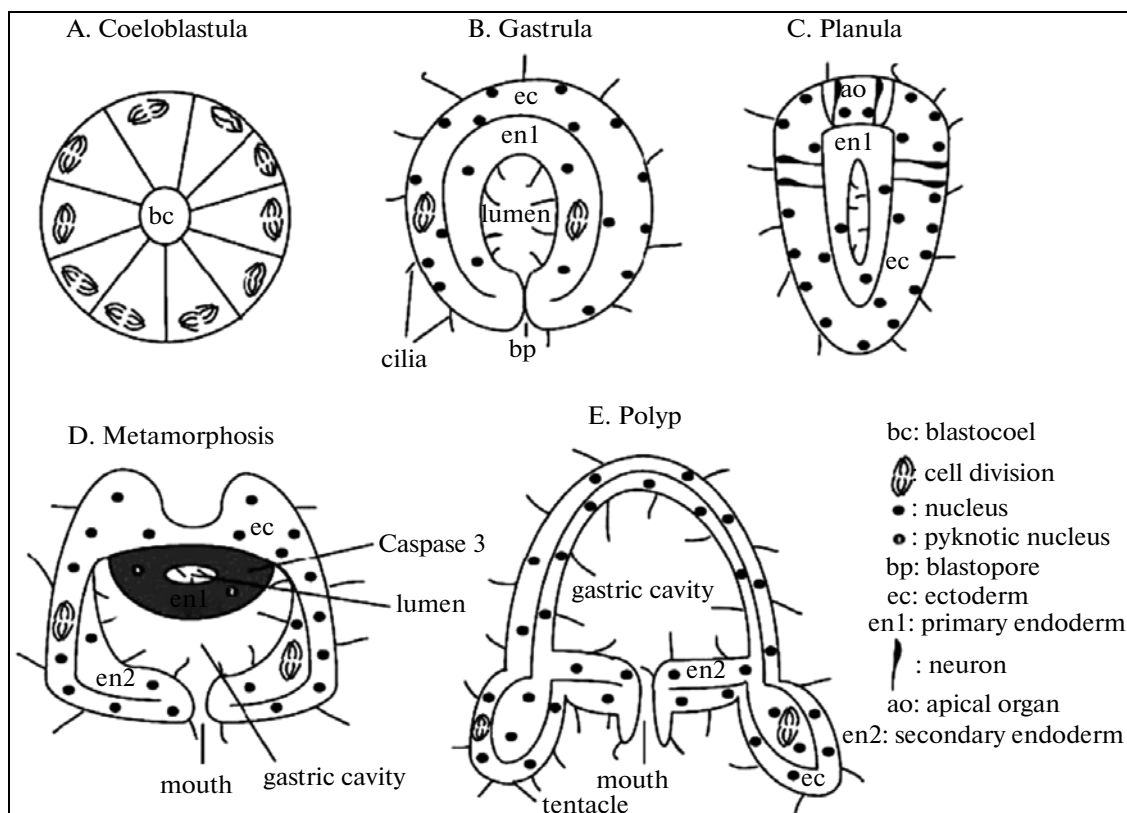


Рис. 1. Схематичное изображение раннего развития *A. aurita* (из Yuan et al., 2008). Аборальный полюс сверху. А – эмбрион на стадии дробления, формирующий целобластулу. В–Е – продольные срезы через центр соответствующей стадии развития. В – появляется область инвагинации, формируется гастрюла с ресничным покровом, закладываются эктодерма и первичная энтодерма. С – планула с развивающейся нервной системой. Д – начало метаморфоза; первичная энтодерма оказывается сдавленной в районе аборального полюса, одновременно с этим в клетках первичной энтодермы выявляется каспаза-3. С оральной стороны формируется вторичная энтодерма, которая вскоре начинает распространяться в аборальном направлении. Е – закладка и рост щупалец полипа, завершение метаморфоза.

(Lesh-Laurie and Suchy, 1991). Лишь недавно на основе иммуно-цитохимических методов были частично описаны апикальный орган и нервная система при развитии и метаморфозе планулы *A. aurita* (Nakanishi et al., 2008).

В недавней работе (Yuan et al., 2008), использование конфокальной лазерной и электронной микроскопии позволило авторам обнаружить интересное явление: в процессе метаморфоза планулы в первичный полип ее энтодерма (“первичная” по терминологии авторов) замещается на “вторичную”, происходящую из эктодермального пласта. При этом “первичная” энтодерма подвергается дегенерации и апоптозу (рис. 1).

Наряду с изучением морфологических процессов, происходящих в раннем онтогенезе стрекающих, необходимо понимание регуляции этих процессов, в первую очередь, процессов метаморфоза. Предположительно, регуляторную функцию при метаморфозе выполняют различные нейроактивные вещества, секретлируемые нервной системой. Эти вещества также могут

принимать участие в регуляции онтогенеза на до-нервных стадиях развития (Bosch and Fujisawa, 2001; Buznikov et al., 2003; Katsukura et al., 2004). Каждая стадия развития характеризуется своим специфическим пространственным паттерном клеток с нейроактивными веществами. При переходе к последующей стадии нервная система предыдущей стадии часто полностью или частично утрачивается (Martin, 2000; Nakanishi et al., 2008; Seipp et al., 2010).

Нейрональная организация личинок стрекающих изучена достаточно подробно. У планул гидроидных клетки с нейроактивными веществами концентрируются на переднем полюсе тела, отдельные клетки встречаются в слое эктодермы на протяжении всего тела личинки (Martin, 1988, 1992b; Gröger and Schmid, 2001; Nakanishi et al., 2008). Эти нервные клетки, а также их отростки могут содержать такие нейроактивные вещества, как GLW-, LW-, RF- и FMRF-амиды, серотонин, таурин, дофамин, γ -аминомасляную кислоту, тирозинированный тубулин и пр. (Gröger and

Schmid, 2001; Katsukura et al., 2004; Boero et al., 2007; Kass-Simon et al., 2007; Nakanishi et al., 2008). Планулы *Aurelia aurita*, как и большинство планул других стрекающих, имеют эктодермальную нервную систему, состоящую из нескольких типов FMRF-амид-положительных нейронов. Это “апикальные нейроны” – клетки апикального органа, расположенного на переднем полюсе личинки; “латеральные нейроны” – клетки в боковой эктодерме. Аксоны нейронов апикального органа образуют сплетение в основании апикального органа и тянутся вдоль мезоглеи к заднему концу планулы (Nakanishi et al., 2008).

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. Скопление эктодермальных нейронов на переднем конце планулы полностью дегенерирует, и “вторичная” нервная система, в которой нейроны располагается преимущественно на оральном конце полипа (соответствующем заднему концу планулы), развивается *de novo* (Nakanishi et al., 2008).

В настоящей работе проведено исследование развития и строения планулы *Aurelia aurita* в момент ее оседания и метаморфоза. На основании цейтраферной микро-видеосъемки и исследования гистологического строения личинки на разных стадиях метаморфоза показано, что лишь часть “первичной” эндодермы планулы, возможно, подвергается дегенерации. Вместе с тем полученные данные свидетельствуют о том, что внутренняя выстилка манубриума первичного полипа (соответствующая гастродерме) происходит из эктодермального слоя заднего конца планулы. Впервые на *A. aurita* проведено изучение пространственной и временной динамики распределения серотонин-эргических клеток с начальных стадий развития зародыша до формирования первичного полипа. Также было прослежено распределение тирозинированного тубулина и нейропептида RF-амида на разных стадиях развития *A. aurita*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования – сцифомедуза *Aurelia aurita* (Linnaeus, 1758). Материал собирали на Беломорской биостанции им. Н.А. Перцова МГУ (Кандалакшский залив Белого моря). Из ротовых лопастей половозрелых медуз извлекали зародышей на различных стадиях развития от зиготы до полностью сформированных планул. Полученных зародышей помещали в чашки Петри с фильтрованной морской водой, где продолжалось их развитие вплоть до оседания и метаморфоза планулы в первичный полип. Необходимые стадии фиксировали для дальнейшего исследования.

Цейтраферную видеосъемку оседания и метаморфоза планул проводили под микроскопом МБИ-1 с помощью цифровой камеры Score Tek DCM130E, подключенной к компьютеру, и программы Score Photo (V 3.0.12.146). Видеомонтаж цифровых фотографий производили с помощью Sony Vegas V 8.0.

Фиксацию для световой и электронной микроскопии осуществляли 2.5% раствором глутаральдегида на фосфатном буфере (PBS, pH 7.4), изотоническом морской воде (Millonig, 1964) (1 час при 4°C) с пост-фиксацией 1% раствором OsO₄ на том же буфере в течение 1 часа. До последующей обработки фиксированный материал хранили в 70° этаноле при 4°C. Для микроскопического исследования материал заливали в смесь эпона и аралдита (Electron Microscopy Sciences). Серийные полутонкие срезы получали на ультратоме Leica. Срезы окрашивали смесью толуидинового синего и метиленового синего (Миронов и др., 1994). Исследование и фотографирование срезов проводили на микроскопе Leica DM2500.

Для сканирующей микроскопии фиксированный материал обезвоживали в серии спиртов и ацетоне и высушивали в критической точке CO₂. Высушенные образцы монтировали на столики, напыляли сплавом золота с палладием и исследовали на микроскопах CAM SCAN и SCAN JSM (Japan).

Иммуно-цитохимическое окрашивание осуществляли по следующему протоколу. Материал фиксировали 4% параформальдегидом на PBS (pH 7.4, Sigma) на холоду (4°C) в течение суток, затем фиксатор заменяли на свежий и далее хранили при 4°C до окрашивания (в течение 1–2 месяцев). Перед окрашиванием образцы отмывали от фиксатора в четырех сменах бычьего сывороточного альбумина (3% BSA, Sigma, USA) на PBS (pH 7.4) с детергентом (0.3% Triton-X100, Ferak Berlin, Germany). После отмывания наносили первичные антитела, инкубация в которых длилась 12 часов при 4°C. В работе были использованы следующие первичные антитела:

– polyclonal rabbit Anti-Serotonin (1 : 1000) (AB938, Chemicon, USA);

– rabbit Anti-RF-amide (1 : 3000) (amidation-sensitive anti-RFamide antibody 1773 IIIp) (получены от проф. Г. Пликерта);

– monoclonal mouse Anti-Tyrosine Tubulin (1 : 1600) (T 9028, Sigma, Germany).

От первичных антител материал отмывали в четырех сменах BSA на PBS и наносили вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромами TRITC или FITC. Инкубация во вторичных антителах длилась 12 часов при 4°C, после чего производили отмывку образцов так же, как и от первичных антител. Вслед за этим в течение 5 минут проводили окрашивание ядер при помощи

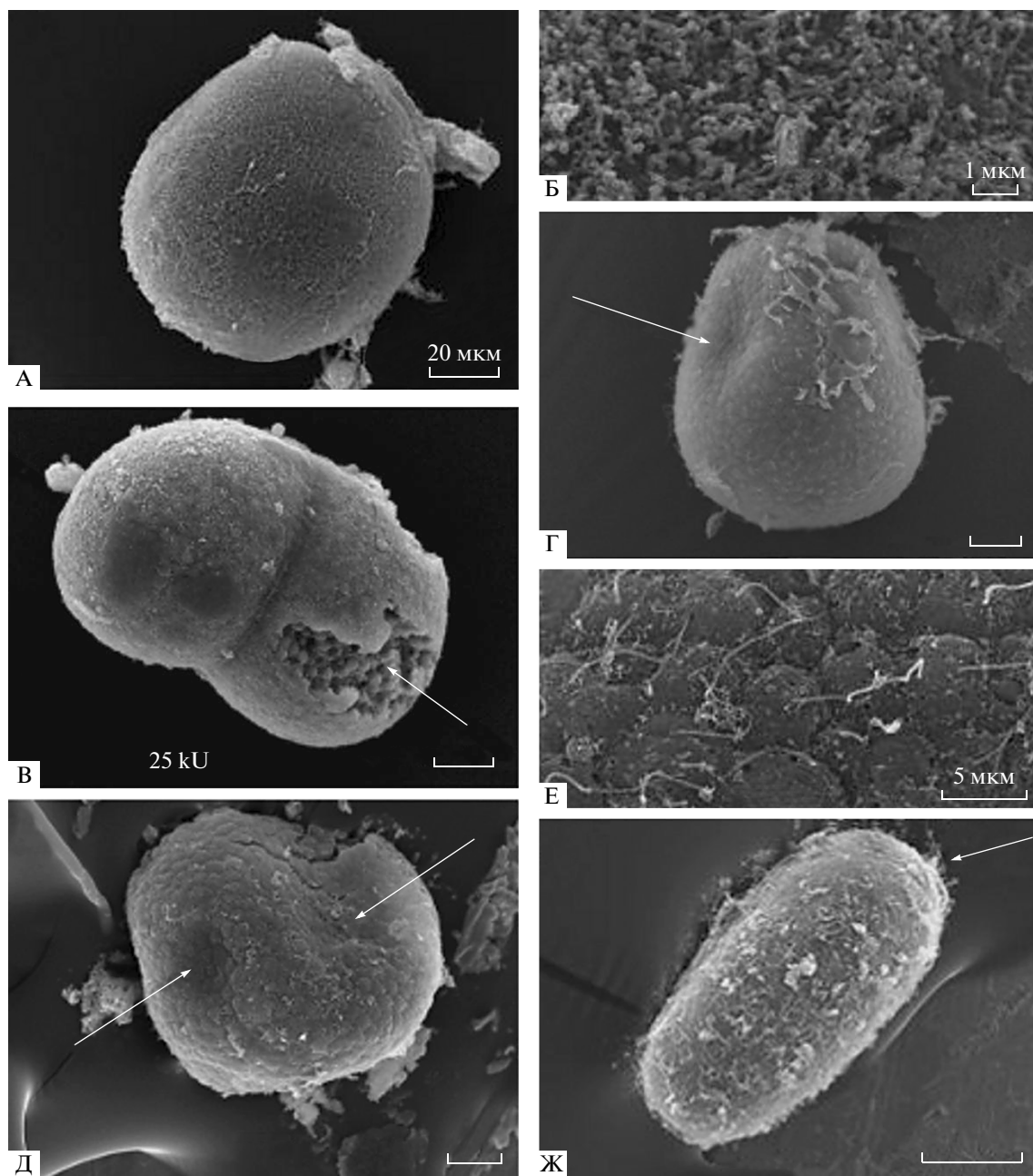


Рис. 2. Раннее развитие *A. aurita*. А – ооцит. Б – поверхность ооцита, микроворсинки. В – двухклеточный эмбрион, стрелкой указаны желточные гранулы, видимые на сколе препарата. Г, Д – начало гастрюляции, стрелками указаны впячивания, связанные с инвагинацией или иммиграцией клеток. Е – поверхность эмбриона на стадии гастрюляции, на клетках видны реснички. Ж – планула, вид сбоку, стрелкой указан передний конец, имеющий более тупую форму, чем задний конец. Масштабная линейка: А, В, Г, Д – 20 мкм, Б – 1 мкм, Е – 5 мкм, Ж – 50 мкм.

DAPI (100 ng/ml; Sigma). Избыток DAPI отмывали в трех сменах дистиллированной воды. Материал заключали в 2.5% DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, Aldrich-Chemie) в 90% глицерине на PBS. Визуализацию результатов проводили при помощи лазерных конфокальных микроскопов Leica TCS SPE и Olympus fluoview FV10i. В качестве отрицательного контроля иммуоцитохимическое окрашивание проводили без первичных

антител; флуоресценция на таких препаратах отсутствовала.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфология

Ооциты *Aurelia aurita* имеют округлую форму, их диаметр составляет около 90 мкм (рис. 2А).

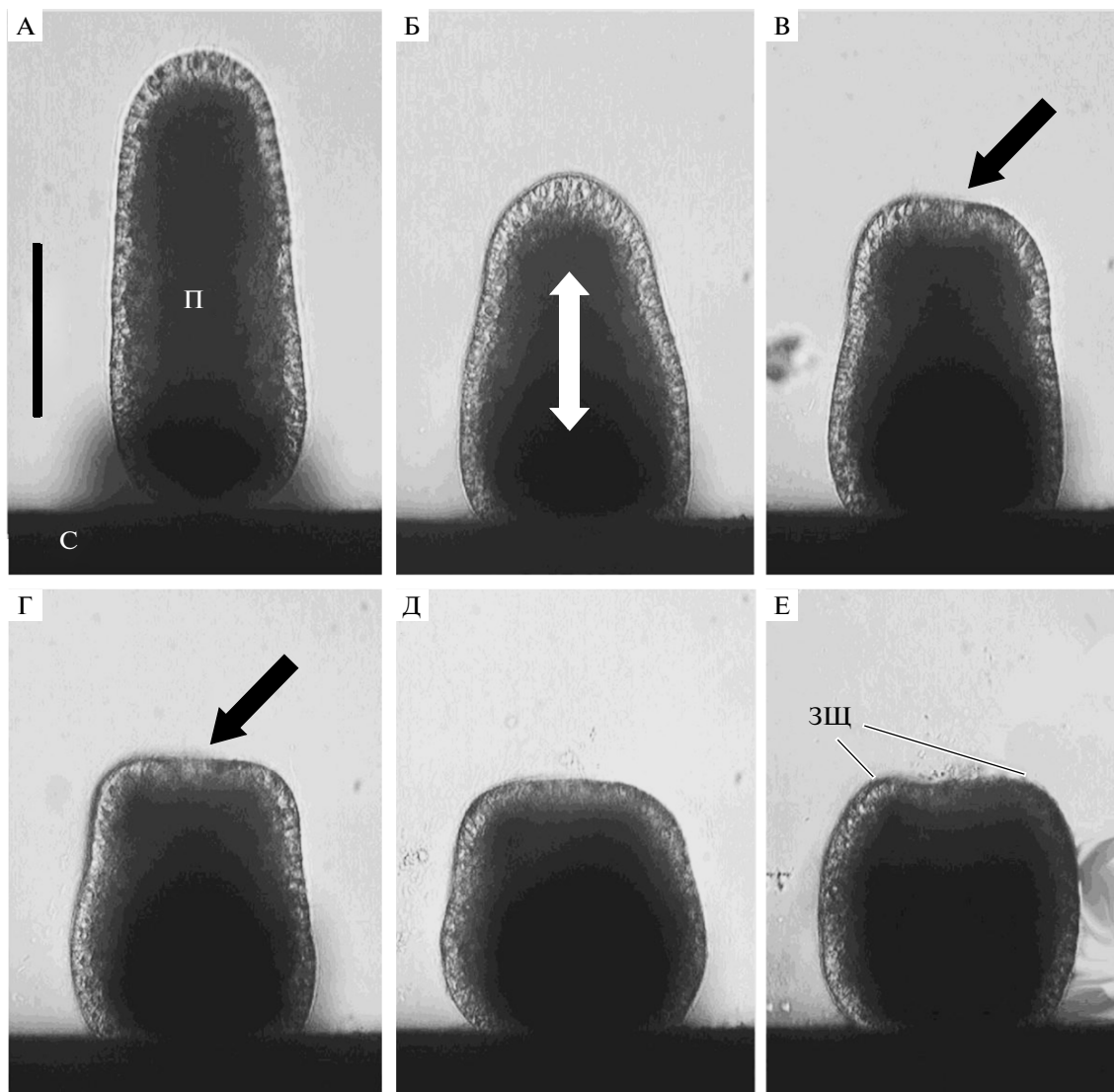


Рис. 3. Последовательность прикрепления и начала метаморфоза планулы *A. aurita* (последовательные кадры из центрифужной видеосъемки). А – Начало прикрепления планулы к субстрату. Б – Образование контакта с субстратом за счет расширения переднего конца планулы. Стрелки показывают направления периодических сжатий-удлинений планулы. В–Д – “Проваливание” заднего конца планулы. Стрелки указывают на отверстие воронки. Е – Завершение оседания, начало формирования щупалец. ЗЩ – зачатки щупалец; П – планула; С – субстрат. Масштабная линейка – 100 мкм.

Поверхность ооцита покрыта многочисленными микроворсинками (рис. 2Б). После первого деления дробления образуется двухклеточный зародыш; на сколе препарата видно, что бластомеры содержат большое количество желточных гранул (рис. 2В), накопленных ооцитом в течение оогенеза. В ходе дробления бластомеры сохраняют достаточно прочные контакты друг с другом, и к моменту начала гаструляции эктодерма представляет собой эпителий. О начале гаструляции можно судить по впячиваниям стенки эмбриона (рис. 2Г). Иногда у эмбриона можно обнаружить несколько впячиваний одновременно (рис. 2Д). Во время гаструляции на поверхности эмбриона появляются рес-

нички (рис. 2Е), которые вначале присутствуют не на всех клетках. После завершения гаструляции зародыш начинает вытягиваться и принимает форму типичной планулы (рис. 2Ж).

Оседание, прикрепление и метаморфоз планул *A. aurita* проходит по типичному для большинства стрекающих сценарию. Анализ проведенной центрифужной видеосъемки выявил интересный момент на заключительных стадиях прикрепления планулы к субстрату. Планула *A. aurita* прикрепляется к субстрату передним, несколько расширенным концом, располагаясь вертикально (продольная ось планулы перпендикулярна поверхности субстрата) (рис. 3А). После прикрепления

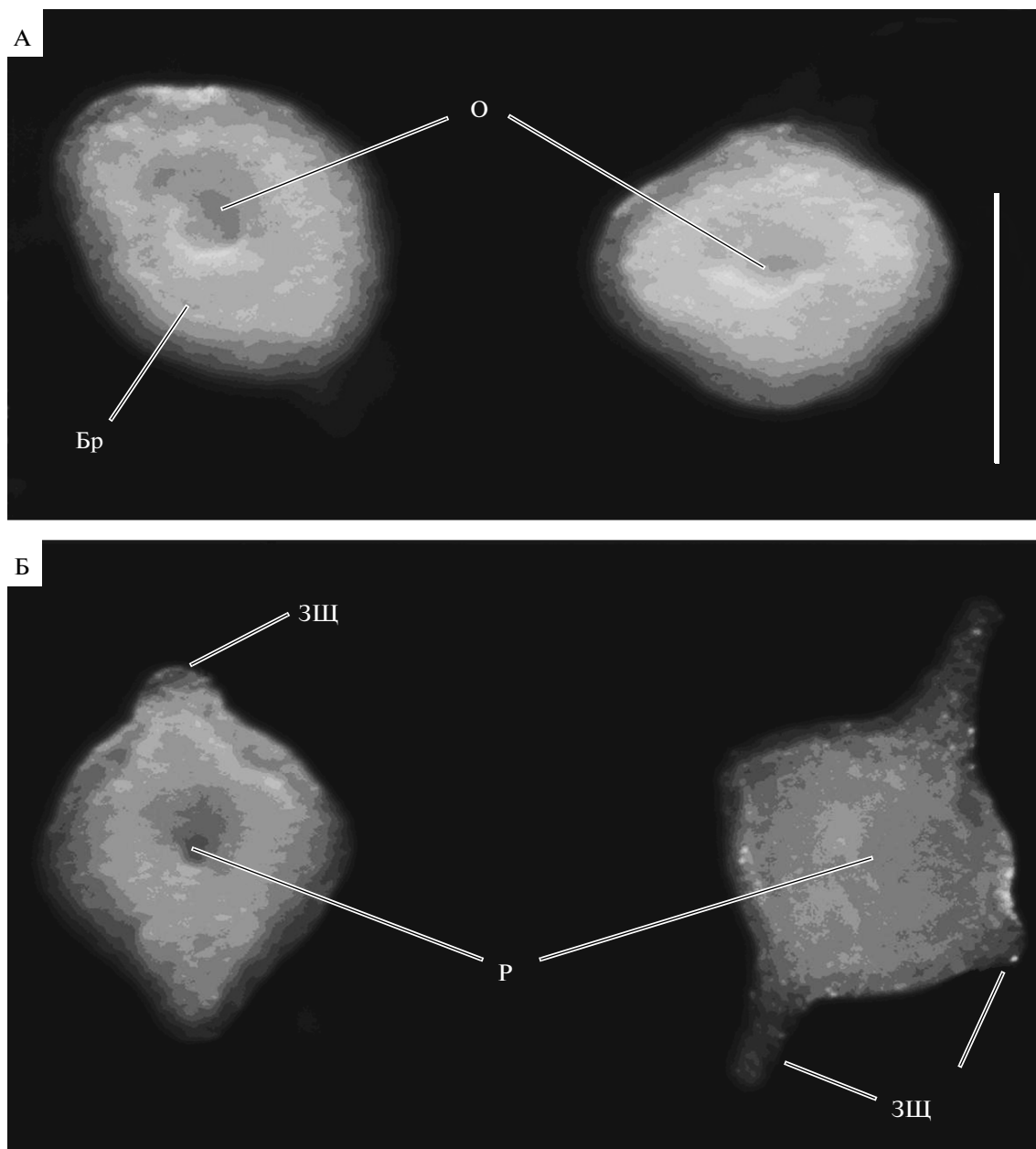


Рис. 4. Метаморфоз планулы *A. aurita*, вид с оральной стороны. Микроскопия при боковом освещении. А – “Проваливание” заднего конца планулы, формирование ротового отверстия. Б – Закладка щупалец первичного полипа. Br – борозда, ограничивающая наружный край воронковидного углубления; ЗЩ – зачатки щупалец; О – место расположения отверстия, соединяющего полость воронки с гастральной полостью первичного полипа; Р – ротовое отверстие. Масштабная линейка – 100 мкм.

начинаются периодические продольные пульсации тела планулы, в результате которых передний конец планулы несколько расширяется, обеспечивая больший контакт с субстратом, а само тело планулы несколько укорачивается (рис. 3Б). В определенный момент задний конец планулы как бы “проваливается” (втягивается) внутрь тела планулы (рис. 3В–Д). Этот процесс происходит относительно медленно – при температуре 16–18 градусов на это требуется около 3-х часов. По

окончании втягивания заднего конца планулы принимает почти шаровидную или кубовидную форму (при рассмотрении сбоку), и далее ее размеры не изменяются.

После втягивания заднего конца планулы, на будущей оральной поверхности полипа можно обнаружить кольцевую борозду (рис. 4А). В центре поверхности, ограниченной бороздой, видно место будущего ротового отверстия, обозначенное небольшим углублением. В дальнейшем на

некотором расстоянии от центра оральной стороны осевшей планулы, снаружки от борозды, закладываются зачатки щупалец (рис. 3Е). Чаще всего сначала происходит закладка двух противоположных щупалец, а затем, с очень коротким интервалом, — еще двух противоположных, в плоскости, перпендикулярной плоскости первой пары щупалец (рис. 4Б). На основании анализа цейтраферной видеосъемки можно предположить, что удлинение щупалец происходит преимущественно за счет миграции клеток. Гастродермальные клетки, формирующие внутренний стержень щупалец, при перемещении в ось щупальца увеличиваются в размерах за счет вакуолизации, а эпидермальные клетки с боковых сторон первичного полипа перемещаются к основаниям щупалец, а затем и по мере их удлинения — в направлении их дистальных концов.

Исследование **гистологического строения** планулы на последовательных стадиях ее развития, оседания и метаморфоза в первичный полип выявило следующие закономерности.

Плавающая и компетентная к метаморфозу планула *A. aurita* имеет типичное для планул стрекающих строение. Форма планулы широкоовальная, с чуть более широким передним концом. В поперечном сечении планулы часто имеют уплощенную овальную (иногда треугольную), а не цилиндрическую форму (рис. 4А). Эктодермальный ресничный слой имеет четкую эпителиальную структуру, с несколько более высокими клетками на переднем конце планулы. Эктодермальный слой планулы содержит разнообразные типы клеток — опорные (эпителиально-мускульные), несколько типов железистых клеток, нервные и стрекательные клетки. Стрекательные клетки более многочисленны на заднем конце планулы, но имеются и на самом переднем конце.

Эндодерма также структурирована и эпителизирована, и в передней половине планулы заметна полость. В клетках много гранул запасных питательных веществ, которые в **эктодерме** в основном сконцентрированы в базальных частях клеток (рис. 5А, Б). Мезоглея тонкая и рыхлая, в результате чего пласты достаточно легко смещаются друг относительно друга (как и у сцифополипов).

При контакте с субстратом передний конец планулы несколько расширяется, и ее общая форма становится грушевидной. Эктодермальный слой в месте контакта с субстратом утончается (рис. 5Б). Организация эндодермы не претерпевает значительных изменений.

С началом процесса “погружения” (втягивания) заднего конца в тело оседающей планулы на гистологических срезах становится заметным утолщение эктодермального слоя на будущем оральном полюсе. На срезе это утолщение выгля-

дит как “пробка”: ее периметр отмечен бороздой на внешней поверхности (рис. 5В).

По мере дальнейшего метаморфоза в центре утолщения эктодермы на заднем конце планулы становится заметным небольшое углубление (рис. 4А). Это углубление увеличивается, и “пробка” трансформируется в воронковидное впячивание эктодермы. При этом эндодерма планулы частично сжимается формирующейся “воронкой”, а частично отодвигается на периферию (рис. 5Г).

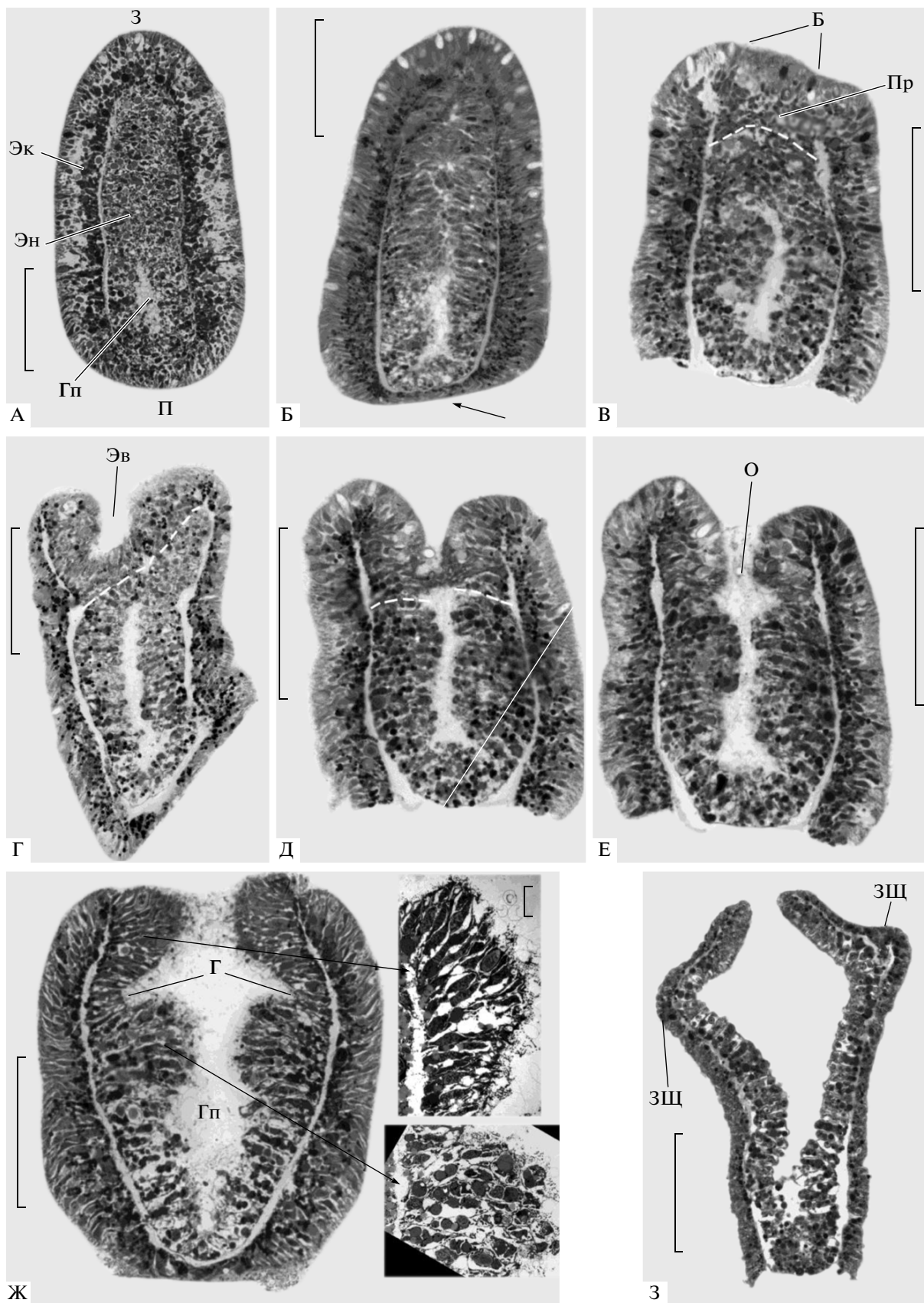
Процесс погружения и разрастания эктодермальной “воронки” завершается образованием отверстия в эндодермальном слое, прилежащем ко дну “воронки”, а затем и соответствующего отверстия в самой эктодермальной “воронке”. При этом по периметру отверстия происходит слияние эктодермальной выстилки “воронки” и эндодермы (рис. 5Д–Ж). С этого момента у первичного полипа появляется мешковидная гастральная система. Стенки эктодермальной “воронки” прижимаются изнутри к внешней эктодерме, в результате чего формируется двуслойная стенка тела переднего отдела первичного полипа. Место слияния эктодермальной и эндодермальной выстилки маркирует границу между манубриумом (ротовым конусом) и желудочным отделом гастральной системы полипа. Граница между внутренней эктодермальной выстилкой ротового конуса (манубриума) и нижележащей эндодермальной выстилкой желудочного отдела хорошо различима: во-первых, выстилка ротового конуса несколько тоньше выстилки желудочного отдела, а, во-вторых, выстилки этих отделов отличаются по составу и структуре слагающих их клеток (рис. 5Ж).

Часть эндодермы планулы, которая была “отжата” вворачивающейся и развивающейся эктодермальной “воронкой” “исчезает”. Анализ нескольких серий гистологических срезов последовательных стадий метаморфоза личинки не позволяет однозначно судить о том, что происходит с этой эндодермой — она дегенерирует или же входит в состав эндодермы желудочного отдела полипа.

Затем у первичного полипа начинается формирование щупалец (рис. 5Е), почки которых закладываются на границе ротового конуса и желудочного отдела первичного полипа (рис. 5Е).

Нервная система

Основное внимание в исследовании характера и динамики распределения нейроактивных веществ было уделено моменту оседания и метаморфоза планулы в первичный полип. Кроме этого, было проведено выявление нейроактивных



веществ на ранних эмбриональных стадиях развития *A. aurita*.

Серотонин обнаруживается уже на стадии дробления почти во всех бластомерах на предгастрюляционной стадии развития зародыша (рис. 6А). Внутри клеток серотонин заключен в крупные гранулы, которые равномерно распределены по цитоплазме клеток. Другие нейральные маркеры до стадии гастрюляции включительно выявлены не были.

По мере дальнейшего развития зародыша паттерн распределения серотонина меняется. На стадии препланулы серотонин-содержащие клетки остаются только в эктодермальном слое, при этом основное их количество обнаруживается на переднем полюсе планулы. Препланулы, не готовые к метаморфозу, содержат небольшое число удлинённых серотонин-содержащих клеток на переднем конце (рис. 6Б). Ядра в этих клетках смещены базальнее по сравнению с другими эктодермальными клетками, при этом серотонин локализован лишь в апикальной части цитоплазмы этих клеток (рис. 6Б, В). У зрелых же, компетентных к метаморфозу планул, серотонин выявлен в большинстве клеток на переднем полюсе. К этому времени серотонин занимает как апикальную, так и базальную цитоплазму клеток (рис. 6Г).

Помимо клеток апикального органа, серотонин выявляется в отдельных клетках в латеральных областях эктодермы планулы (рис. 6Д). По форме эти клетки напоминают иммуноположительные клетки переднего полюса: они имеют столбчатую форму и слегка сужаются в базальном направлении. Их базальная поверхность граничит с мезоглеей, апикальная поверхность выходит во внешнюю среду. Вместе с тем каких-либо клеточных отростков, отходящих от базальной части клеток и содержащих серотонин, не выявлено.

Изучение распределения **RF-амида** позволило получить наиболее интересные данные о строении нейронов у планул *A. aurita*. При помощи антител к RF-амиду удалось выявить не только тела нервных клеток, но и их отростки (рис. 6Е). Тела RF-амид-положительных клеток расположены в латеральной эктодерме планулы, клетки столбчатой формы, апикальной мембраной выходят на

поверхность планулы. На самом переднем полюсе RF-амид-положительных клеток не выявлено. Отростки RF-амид-содержащих клеток отходят от их базальных частей и направляются в сторону переднего полюса планулы. Сами отростки при этом проходят под слоем эктодермы, вдоль длинной оси животного, в области мезоглеи. RF-амид-содержащие клетки у планул *A. aurita* единичны.

При помощи антител к **тирозинированному тубулину** удалось выявить тонкие отростки толщиной около 2 мкм, проходящие вдоль всего тела планулы в области мезоглеи (рис. 7А). При этом тела нейронов, содержащие какие-либо нейрональные вещества или тубулин, не обнаружены, поэтому место отхождения иммуноположительных отростков до сих пор остается не выявленным.

С началом метаморфоза нейроны при помощи использованных антител перестают выявляться. У прикрепившейся к субстрату планулы не обнаружены серотонин и нейропептиды, также на этой стадии становятся неразличимы волокна, содержащие тирозинированный тубулин. В начале закладки гипостома и почек щупалец реакция на антитела также отрицательная.

Позже, когда первичный полип уже достаточно развит и способен добывать пищу, в его щупальцах можно различить волокна, содержащие тирозинированный тубулин (рис. 7Б). Особенно хорошо эти волокна различимы в основании щупальца и в его проксимальной половине. На некоторых препаратах можно обнаружить клетки, которые предположительно несут подобный отросток: они дают интенсивную реакцию на антитела к тирозинированному тубулину. Тела таких клеток, по-видимому, расположены в основании эктодермального слоя.

ОБСУЖДЕНИЕ

Детальное изучение начальных стадий развития представителей практически любых групп многоклеточных животных, даже хорошо известных по монографиям и учебникам, зачастую позволяет выявить ряд новых интересных фактов.

Рис. 5. Изменение внутренней организации планулы *A. aurita* в процессе оседания и метаморфоза в первичный полип. Продольные срезы. А – Организация планулы, компетентной к оседанию. Б – Прикрепление планулы к субстрату, истончение эктодермального слоя в месте контакта (стрелка). В – Начало “погружения” заднего конца планулы. Г – образование эктодермальной “воронки” и отсечение ею части эндодермы. Д – слияние эндодермы с эктодермальной “воронкой”. Е – образование отверстия в дне эктодермальной “воронки”. Ж – завершение формирования гастральной системы первичного полипа; на вставках показаны соответствующие участки (стрелки) внутренней выстилки первичного полипа при большем увеличении (масштабная линейка – 5 мкм). З – начало закладки щупалец первичного полипа. Б – борозда, ограничивающая эктодермальную “робку”; Г – граница между эктодермальной выстилкой манубриума и эндодермальной выстилкой желудочного отдела полипа; Пп – гастральная полость; З – задний конец планулы; О – отверстие между эктодермой и эндодермой; П – передний конец планулы; Пр – эктодермальная “пробка” на заднем конце планулы; Эв – эктодермальная “воронка”; Эк – эктодерма; Эн – эндодерма; пунктирная линия – граница между эктодермой и эндодермой. Масштабная линейка – 50 мкм.

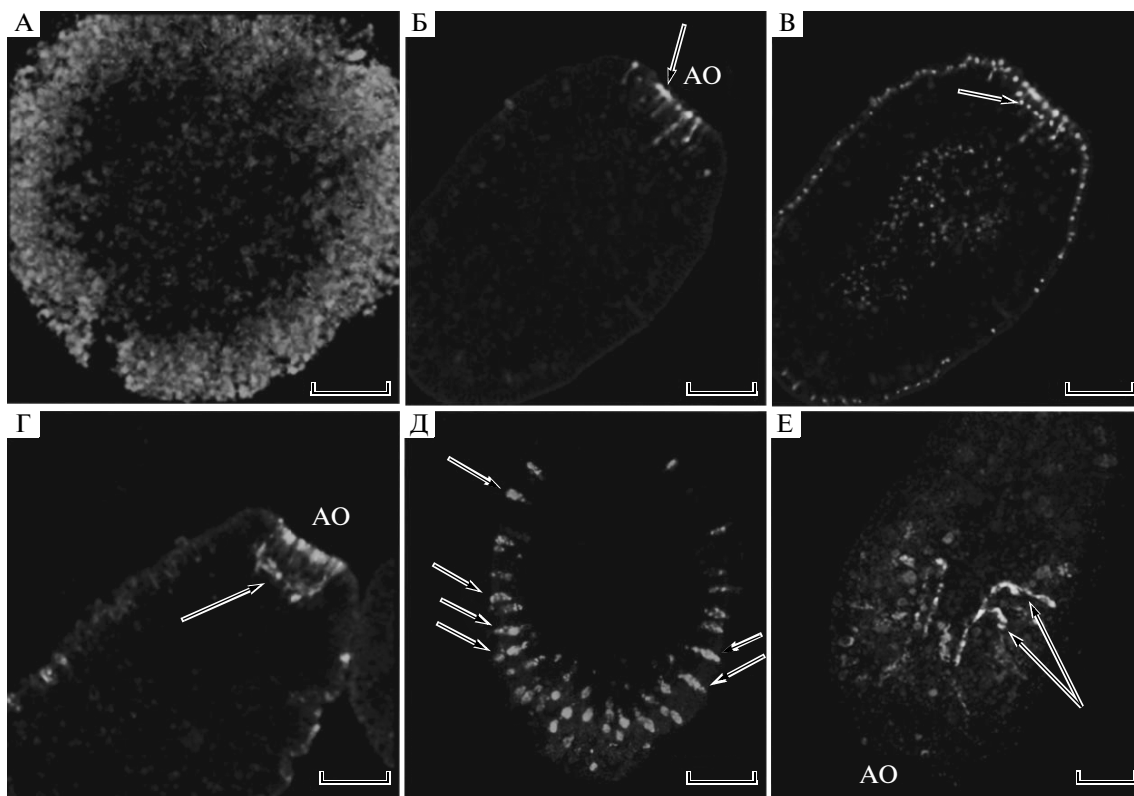


Рис. 6. Распределение серотонина и RF-амида на предгаструляционной стадии и в процессе созревания планулы *A. aurita*. А – оптический срез эмбриона на предгаструляционной стадии, реакция против серотонина. Б – сагиттальный оптический срез препланулы, стрелкой указаны серотонин-положительные клетки на переднем конце. В – препланула, наложение двух каналов: серотонин (снимок, идентичный 6Б) и ядра. Стрелка указывает на ядра серотонин-содержащих клеток передней эктодермы. Г – сагиттальный оптический срез планулы, стрелка указывает на серотонин-положительные клетки на переднем конце. Д – максимальная проекция стопки из 12 оптических срезов, выполненных в парасагиттальной области планулы с шагом 2 мкм, реакция против серотонина, стрелки указывают на иммуноположительные клетки в латеральной эктодерме. Е – максимальная проекция 33 сагиттальных оптических срезов (шаг 2 мкм) планулы, реакция против RF-амида, стрелками отмечены иммуноположительные клетки в латеральной эктодерме. АО – апикальный орган. Масштабная линейка – 50 мкм.

Развитие личинки и ее метаморфоз.

Развитие планулы *Aurelia aurita* принципиально не отличается от такового, многократно описанного для представителей разных групп стрекающих. Дробление начинается в виде врезающейся борозды, которая появляется, как принято считать, с анимального полюса (Freeman et al., 1980, 1990; Fautin, 2002), и заканчивается формированием бластулы с небольшой полостью. Гастрюляция осуществляется или путем мультиполярной иммиграции, или путем инвагинации с анимального (что еще не было доказано однозначно) полюса, или, что более вероятно, обоими способами одновременно (Серавин, 1988, 1989; Lesh-Laurie and Suchy, 1991; Ю. Краус – личные сообщения). В пользу участия в гастрюляции мультиполярной иммиграции свидетельствуют несколько впаиваний на поверхности бластулы, которые могут соответствовать не только месту инвагинации пласта, но и месту выселения из него клеток (Yuan et al., 2008; Kumburegama et al. 2011).

В результате формируется типичная двухслойная планула. Для *A. aurita* характерно формирование планулы с обоими эпителизованными слоями – эктодермой и эндодермой, и небольшой полостью внутри. Эпителизация эндодермы заметно менее правильная, по сравнению с таковой эктодермы, особенно в области заднего конца планулы. Однако эндодерма зрелой планулы *A. aurita* отличается от таковой у ряда представителей атекатных гидроидных, у которых эндодерма остается неэпителизованной и представляет собой рыхлое скопление крупных, часто вакуолизированных клеток (Weis et al., 1985; Kroiher et al., 1990; Walther et al., 1996). Строение зрелой планулы *A. aurita* представляет собой промежуточное состояние между планулами ряда текатных гидроидных и личинками кораллов (Burton et al., 2004; Kraus et al., 2007).

Процесс оседания и метаморфоза планулы *A. aurita* проходит по классической для стрекающих с прикрепленной полипоидной стадией схе-

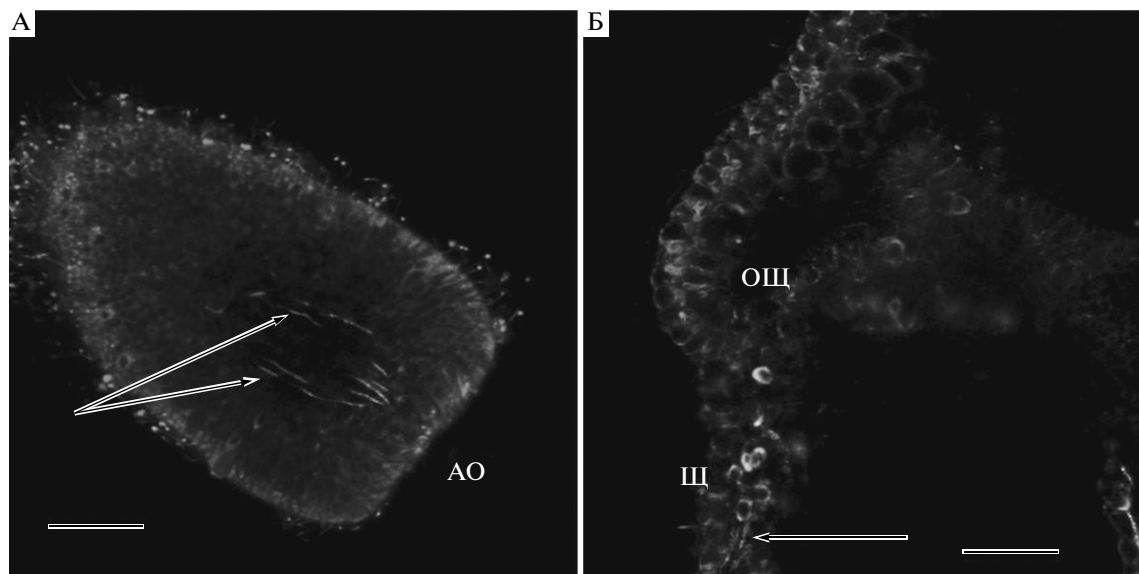


Рис. 7. Распределение тирозинированного тубулина у планулы и сцифистомы *A. aurita*. А – максимальная проекция 4 продольных оптических срезов, выполненных с шагом 2 мкм в парасагиттальной области планулы, стрелки указывают на тонкие иммуноположительные отростки в области мезоглеи. Б – продольный оптический срез сцифистомы, область отхождения щупальца, стрелки указывают на тонкие иммуноположительные отростки в щупальце. АО – апикальный орган; ОЩ – основание щупальца; Щ – щупальце. Масштабная линейка – 50 мкм.

ме: личинка своим передним концом прикрепляется к субстрату, прижимается к нему и претерпевает метаморфоз (Марфенин и Косевич, 1984; Plickert et al., 1988; Kroiher et al., 1990; Sommer, 1990; Walther et al., 1996). В результате формируется первичный полип (сцифистома). Сам метаморфоз в большей степени напоминает метаморфоз атекатных гидроидных, у которых личинка не расплывается полностью по субстрату, и ее внутренняя организация претерпевает меньшие изменения, чем таковая у текатных гидроидных (Sommer, 1990). Планула *A. aurita* лишь незначительно расширяется и сокращается в длину в процессе прикрепления к субстрату и запуска метаморфоза. Ее тканевая организация также в значительной степени сохраняется в организации первичного полипа. За исключением процесса формирования манубриума.

Выявленный в настоящей работе процесс формирования манубриума и его внутренней выстилки, рассматривавшейся ранее как энтодермальная по природе, позволяет нам говорить о некоторой связи этих процессов с формированием глотки у кораллов.

У кораллов глотка формируется в конце процесса гастрюляции в результате погружение ротового отверстия внутрь гастральной полости с выворачиванием части двухслойной стенки. Между глоткой и боковыми стенками тела первичного полипа кораллов остается просвет гастральной полости, выстланный гастродермой. В дальнейшем от краев глотки начинается формирование

первичных септ, которые “фиксируют” пространственное положение глотки, не давая ей возможности выворачиваться наружу (Fautin and Mariscal, 1991; Miller and Ball, 2000a; Burton et al., 2004).

У *A. aurita* наблюдается сходный процесс. С началом метаморфоза планулы на ее заднем (будущем оральном полюсе) конце происходит погружение эктодермального слоя. В отличие от соответствующей стадии у кораллов, на будущем оральном полюсе планулы *A. aurita* энтодерма еще не окончательно эпителизована, и поэтому не имеет однослойного строения. Как результат, на заднем конце планулы не может сформироваться правильное двуслойное впячивание. Вместо этого клетки эктодермального пласта в центре заднего полюса планулы становятся более высокими, а сам пласт – более толстым (рис. 5В). Далее в центре этого утолщенного пласта начинает формироваться воронковидное впячивание, которое, погружаясь внутрь планулы, оттесняет энтодерму. По мере погружения эктодермального пласта внутрь планулы и формирования воронковидной структуры часть клеток энтодермы на заднем конце планулы оказывается заключенной между эктодермальным пластом наружной стенки и воронки (Рис. 5Г). В дальнейшем эти клетки, по всей видимости, резорбируются, обеспечивая дополнительное питание личинки в процессе метаморфоза и уменьшая объем личиночной энтодермы. Именно эти клетки и были, по всей видимости, выявлены в работе Яна с коллегами (Yuan et al., 2008) как клет-

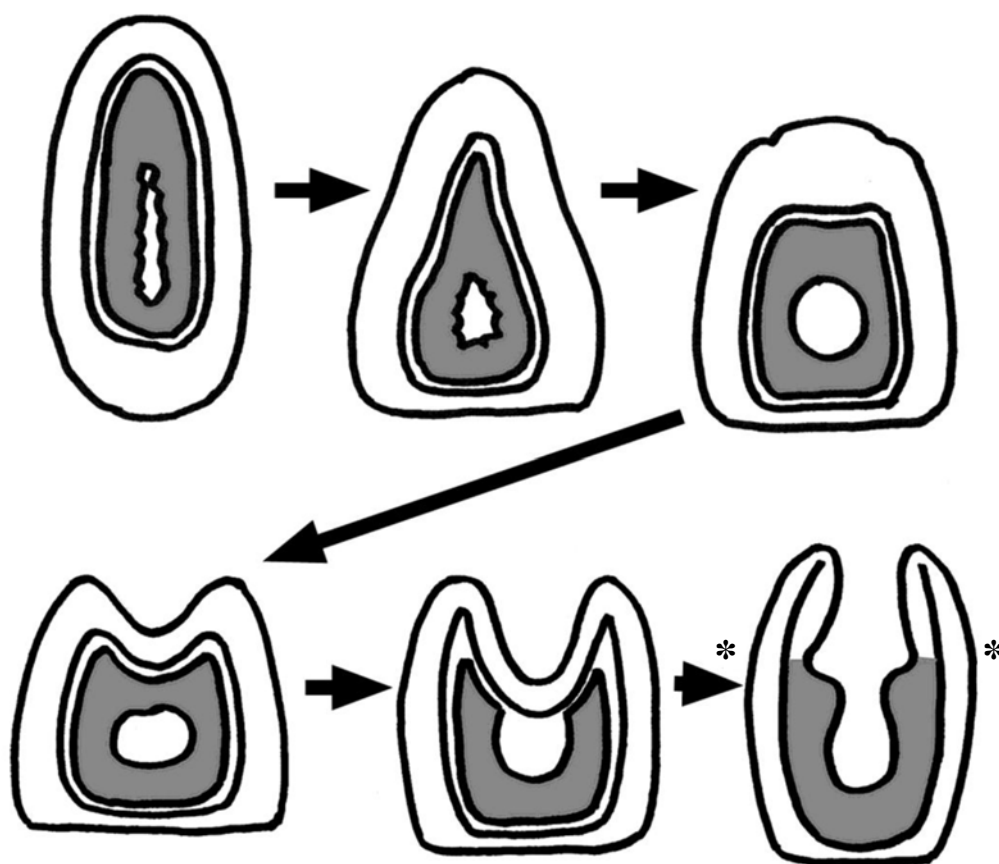


Рис. 8. Схема метаморфоза планулы *A. aurita* и формирования выстилки гастральной полости первичного полипа. На схеме изображены продольные срезы различных стадий метаморфоза, ориентированных оральным полюсом вверх. Серым цветом выделена эндодерма, белым – эктодерма. Звездочками отмечены места закладки щупалец.

ки “первичной” эндодермы, подвергающиеся апоптозу.

Однако, в отличие от указанной этими авторами полной резорбции всей эндодермы планулы, в нашем исследовании четко прослеживается преемственность между эндодермой личинки и гастродермой первичного полипа. Лишь часть эндодермы, по-видимому, подвергается резорбции, как это обычно наблюдается при метаморфозе планулоподобных личинок стрекающих (Seipp et al., 2001). Более того, нами не было отмечено и вворачивания переднего конца планулы внутрь при прикреплении планулы к субстрату. Напротив, происходит расширение и “распластывание” переднего конца планулы по субстрату.

После установления контактов между краями эндодермальной выстилки с эктодермальной воронкой происходит формирование отверстия в центре воронки, соединяющее внешнюю среду с полостью полипа. На этой стадии место перехода эндодермальной выстилки гастральной полости полипа в эктодермальную (по происхождению)

выстилку будущего манубриума четко обозначено кольцевой бороздой (рис. 5Е, Ж).

Различия в толщине внутренней выстилки гастральной полости первичного полипа постепенно сглаживаются (рис. 5З). Тем не менее, клеточная организация этой выстилки на уровне манубриума и желудочного отдела различается. На это обратил внимание еще Чапман (Chapman, 1978) при описании микроанатомии кубуполипа (тогда Cubozoa еще рассматривали входящими в кл. Scyphozoa). Однако никаких последующих исследований проведено не было, и объяснения этому факту дано не было. Полученные в настоящей работе данные позволяют объяснить очевидную разницу в организации внутреннего эпителия гастральной полости первичного полипа *A. aurita* (рис. 8). Кроме того, описанный характер формирования манубриума у сцифополипа в значительной степени напоминает процесс формирования глотки у кораллов. Кораллы в настоящее время рассматривают как группу стрекающих, наиболее близкую по строению и развитию к предковому состоянию (Schuchert, 1993; Kobayashi et al., 1996;

Collins et al., 2005). Если это так, то можно предположить, что формирование манубриума у сцифополипа при метаморфозе непитающейся личинки является некоторым упрощением процесса формирования глотки у кораллов при “прямом” развитии последних. И связано это, скорее всего, с миниатюризацией и общим упрощением полипоидной стадии в жизненном цикле сцифоидных.

Представляет интерес и порядок закладки щупалец у первичного полипа *A. aurita*. Преобладающей симметрией у сцифоидных на полипоидной и медузоидной стадиях является 4-х лучевая симметрия (Lesh-Laurie and Suchy, 1991). Однако в форме зрелой планулы и при ее метаморфозе явно проявляется билатеральная или двулучевая симметрия. На поперечном срезе зрелые плавающие планулы и прикрепившиеся планулы имеют уплощенную форму с преобладанием билатеральной симметрии (рис. 4А). Закладка первых щупалец первичного полипа происходит по схеме 2 + 2, что также подчеркивает двулучевую симметрию. Такие особенности развития сцифоидных также можно рассматривать как “остатки” билатеральности, свойственной предкам стрекающих (Gröger and Schmid, 2001; Martindale et al., 2002; Finnerty et al., 2004), и прослеживающейся в развитии кораллов.

Роль нейроактивных веществ в развитии

Проведенное исследование пространственно- и временного распределения нейроактивных веществ было направлено, в первую очередь, на выявление их потенциальной роли в процессах развития личинки и инициации ее метаморфоза. Полученные нами данные по строению нервной системы и наличию нейроактивных веществ в нейронах *A. aurita* во многом сходятся с результатами предыдущих работ на Cnidaria. Большинство работ по выявлению нейроактивных веществ было проведено на личиночной стадии развития стрекающих (Martin and Chia, 1982; Martin, 1988, 1992a; McCauley, 1997; Gröger and Schmid, 2001; Zega et al., 2007; Nakanishi et al., 2008). В нашей работе эти исследования также проведены и на эмбриональных стадиях развития. Исследование локализации серотонина у *A. aurita* было проведено впервые.

Серотонин выявлен у *A. aurita* уже на стадии ранней гастрюлы в большинстве клеток. К настоящему времени информации о наличии нейроактивных веществ на эмбриональных стадиях стрекающих накоплено мало, однако, считается, что холинэргические, адренэргические и серотонэргические системы представлены на ранних эмбриональных стадиях всех позвоночных и беспозвоночных животных (Buznikov et al., 2003). Поскольку именно на стадии гастрюляции начинается дифференцировка клеток (Yuan et al., 2008;

Marlow et al., 2009), можно предположить, что окрашивание наблюдается в предшественниках опорных клеток как в самом распространенном типе клеток. Следовательно, на этой стадии серотонин не является нейральным маркером, а служит донервным трансмиттером и участвует в передаче межклеточных сигналов, как это было доказано для других беспозвоночных (Buznikov et al., 2001, 2003). Нейротрансмиттеры обеспечивают различные межклеточные взаимодействия, необходимые, в том числе, для контроля митоза и макромолекулярного синтеза (Buznikov and Shmakler, 1981). Поскольку наблюдаемое нами внутриклеточное распределение серотонина имеет гранулярный характер, можно предположить, что серотонин заключен в желточных гранулах. Возможно, в этих местах и происходит его синтез, как это было показано на дробящихся эмбрионах многощетинкового червя *Ophryotrocha labronica* (Emanuelsson, 1974).

Отсутствие RF-амида на эмбриональной стадии развития исключает его роль в передаче сигналов между бластомерами и гастрюляции.

У препланулы серотонин выявляется на переднем полюсе, в апикальных частях эктодермальных клеток. Это связано, скорее всего, с началом формирования апикального органа, сенсорной структуры Scyphozoa (Martin and Chia, 1982; Yuan et al., 2008) и других стрекающих (Chia et al., 1979; Weis et al., 1985; Marlow et al., 2009).

У зрелой планулы везикулы с серотонином выявляются и в базальной, и в апикальных частях клеток апикального органа. Ранее серотонин был обнаружен в клетках переднего полюса планулы *Eudendrium racemosum* (Hydrozoa). Эти клетки имеют колбовидную форму и сужаются в базальном направлении (Zega et al., 2007), как и серотонин-содержащие клетки *A. aurita*. Такая форма может быть связана с наличием нервного отростка: узкая базальная область такой клетки непосредственно переходит в отросток, который, однако, не содержит серотонина ни у *A. aurita*, ни у *E. racemosum*.

Установлено, что планулы *A. aurita* могут воспринимать сигналы от сцифистом своего вида. В ответ на такие сигналы планулы оседают и вступают в метаморфоз в уже сформированной колонии полипов, поскольку скопление предшественников указывает на место с благоприятными условиями для их развития (Gröndahl, 1989). Центральную роль в этом процессе может играть апикальный орган как секреторно-сенсорный аппарат, клетки которого, по-видимому, способны выделять серотонин во внешнюю среду и/или внутриклеточное пространство. Следовательно, роль апикального органа состоит и в восприятии внешних химических сигналов, и в передаче этих сигналов другим клеткам планулы (Nakanishi

et al., 2008). На примере гидроидного *Phialidium gregarium* была предложена модель передачи сигналов об инициации метаморфоза личинки (McCauley, 1997). Согласно этой схеме, серотонин выделяется во внешнюю среду в ответ на сигналы, стимулирующие метаморфоз (в данном случае – бактериальная индукция). Далее серотонин из внешней среды взаимодействует с рецепторами соседних клеток и вызывает каскад химических реакций, приводящий к перестройкам клеток согласно программе метаморфоза.

Клетки с отростками, содержащие RF-амид, скорее всего, являются у *A. aurita* сенсорными клетками. Об этом можно судить по их форме. Так, согласно работе Мартин с соавторами (Martin et al., 1983), посвященной метаморфозу планулы *Mitrocomella polydiademata*, нервная система личинки состоит из ганглиозных и сенсорных клеток. Оба типа характеризуются наличием нервного отростка, а отличие заключается в том, что тела ганглиозных клеток расположены на уровне базальной части эктодермы, в то время как сенсорные клетки тянутся от мезоглеи до поверхности личинки, располагаясь, таким образом, по всей толщине эктодермы. Выявленные нами при помощи антител к RF-амиду клетки *A. aurita* похожи по описанию на сенсорные.

Ранее RF-амид-содержащие клетки были обнаружены в латеральной эктодерме планулы *Podocoryne carnea* (Hydrozoa). Эти клетки несут отростки, ориентированные вдоль длинной оси планулы (Gröger and Schmid, 2001). Планулы *Pennaria tiarella* также характеризуются би- и мультиполярными RF-амид-положительными нейронами, контактирующими при помощи отростков с другими нейронами, сенсорными и эпителиально-мышечными клетками (Martin, 1992b; Kass-Simon et al., 2007). Таким образом, RF-амид, присутствующий в нервных клетках и их отростках, может принимать участие в передаче различных сигналов. Кроме этого, есть доказательства отношения этого нейропептида к регуляции метаморфоза планулы: при внесении экзогенного RF-амида в среду с живыми личинками *H. echinata*, у них снижается двигательная активность, и они позже вступают в метаморфоз, чем личинки контрольной группы (Katsukura et al., 2004). Следовательно, RF-амид-содержащие клетки планулы *A. aurita* могут принимать участие в процессе метаморфоза, а также улавливать и передавать другим клеткам различные сигналы из внешней среды.

Выявление нейронов при помощи антител к тирозинированному тубулину возможно благодаря тому, что тела и базальные отростки нервных клеток содержат многочисленные пучки микротрубочек (Martin, 1988; Gröger et al., 2000). Благодаря этому методу были выявлены отростки нервных клеток у планулы *P. carnea* и *E. racemosum*. У

P. carnea нервные отростки образуют четкую сеть, состоящую из продольных и поперечных волокон (Gröger and Schmid, 2001). Нервная сеть *E. racemosum* менее структурирована, чем у *P. carnea*, и представляет совокупность тонких волокон, большая часть которых направлена поперек продольной оси планулы. Волокна, выявленные у планулы *A. aurita*, направлены вдоль длинной оси личинки; поперечные волокна не выявлены, возможно, для их обнаружения необходимы иные методы идентификации нервной ткани. Кроме этого, различие в расположении нервных отростков может свидетельствовать о различных планах строения нервной системы у отдельных видов стрекающих.

Наибольшее число нейронов можно обнаружить у планулы, готовой к оседанию и вступлению в метаморфоз. Однако, после оседания планулы *A. aurita*, в процессе метаморфоза в сцифистому, серотонин и RF-амид исчезают из эпидермы. Во время метаморфоза клетки не включают метки к этим веществам что, скорее всего, связано с апоптозом сенсорных нервных клеток *A. aurita* (Nakanishi et al., 2008). Согласно недавним исследованиям раннего развития и метаморфоза *A. aurita*, после оседания планулы нервные клетки из эктодермы перемещаются в эндодерму будущего абортального полюса полипа. В этой же области отмечают образование апоптотических телец и иммуноцитохимически выявлена каспаза-3, что может свидетельствовать о гибели в том числе и нервных клеток через апоптоз (Nakanishi et al., 2008; Yuan et al., 2008). Апоптоз нервных клеток в ходе метаморфоза также свойственен и планулам гидроидных (Gröger et al., 2000; Seipp et al., 2010).

Однако, даже у только что сформированных первичных полипов *A. aurita* нейрональные клетки выявлены не были. Эти результаты расходятся с полученными ранее данными на различных полипах Cnidaria. Так, серотонин находится во внутринейронных везикулах, нейромышечных и нервосинаптических синапсах у морского анемона *Aiptasia pallida*. У *Renilla coelikeri* серотонин выявлен в телах и отростках нейронообразных клеток, которые контактируют с нематоцитам щупалец (Kass-Simon et al., 2007). Нейропептиды семейства RF-амидов выявлены на полипоидных стадиях *Metridium senile*, *Hydra magnipapillata*, *Anthopleura elegantissima*, *Eirene viridula*, *Alcyonium digitatum* и *H. echinata* (Grimmelikhuijzen, 1983, 1985; Grimmelikhuijzen et al., 1991; Kass-Simon et al., 2007). В большинстве описанных случаев нейроны локализованы в области гипостома и в основании щупалец. У сцифистом *A. aurita* волокна, содержащие тирозинированный тубулин, выявлены в основании и в проксимальной половине щупалец. Возможно, в функционировании нервной системы сцифистом *A. aurita* принимают уча-

стие иные нейроактивные вещества, отличные от исследованных в рамках нашей работы. Кроме этого, есть вероятность, что у разных видов стрекочущих деградация нервных клеток планул в ходе метаморфоза имеет разную степень выраженности, а также могут несколько различаться механизмы самого метаморфоза. Все это может влиять на организацию нервной системы полипа.

Проведенные исследования позволили детально описать и проанализировать процесс метаморфоза планул *A. aurita*. Получены новые данные о формировании частей первичного полипа (сцифистомы) и высказаны предположения о возможных филогенетических связях процесса метаморфоза у сцифоидных и других групп стрекочущих. Впервые подробно исследована пространственная и временная динамика нейроактивных веществ в раннем развитии сцифоидных, что дает возможность не только обрисовать строение нервной системы, но и предположить роль нейроактивных веществ в развитии организма в целом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую признательность за техническую помощь в выполнении работы проф. Г. Пликерту (Университет г. Кельна, ФРГ) (антитела к RF-амиду) и проф. Н. Дулину (Университет г. Чикаго, США); группе оптических методов исследования ИБР РАН за возможность использования конфокальной микроскопии; межкафедральной лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, контракт № П1291.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Догель В.А.* Зоология беспозвоночных: Учебник для ун-тов. Москва: Высшая школа, 1981. 603 с.
- Марфенин Н.Н., Косевич И.А.* Биология гидроида *Obelia loveni* (Allm.) (Сампанулярииды): образование колонии, поведение и жизненный цикл гидрантов, размножение // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16, Биология. 1984. № 3. С. 16–24.
- Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А.* Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. Санкт-Петербург: Наука, 1994. 400 с.
- Серавин Л.Н.* Альтернативные пути развития на ранних этапах эмбриогенеза у некоторых кишечнополостных // Ред.: Колтун В.М., Степаньянц С.Д. Губки и книдарии. Современное состояние и перспективы исследований. Л.: Зоол. ин-т АН СССР, 1988. С. 123–126.
- Серавин Л.Н.* Типы гастрюляции у Scyphozoa // Ред. Колтун В.М., Марфенин Н.Н., Степаньянц С.Д. 1989 4–8 сентября 1989 г. Беломорская биостанция МГУ. Зоологический институт АН СССР. С. 104–106.
- Ball E.E., Hayward D.C., Saint R. and others.* A simple plan – Cnidarians and the origins of developmental mechanisms // Nat. Rev. 2004. V. 5. P. 537–577.
- Boero F., Schierwater B., Piraino S.* Cnidarian milestones in metazoan evolution // ICB. 2007. V. 47. P. 693–700.
- Bosch T.C.* Ancient signals: peptides and the interpretation of positional information in ancestral metazoans // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2003. V. 136. № 2. P. 185–196.
- Bosch T.C.G., Fujisawa T.* Polyps, peptides and patterning // BioEssays. 2001. V. 23. № 5. P. 420–427.
- Brusca R.C., Brusca G.J.* Invertebrates. Sunderland: Sinauer, 2003. 936 p.
- Burton P.M., Pang K., Krone C. and others.* *Nematostella*: a model outgroup for Bilaterian evolution // Developmental Biology. 2004. V. 271. № 2. P. 554–554.
- Buznikov G.A., Lambert H.W., Lauder J.M.* Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis // Cell Tiss. Res. 2001. V. 305. P. 177–186.
- Buznikov G.A., Nikitina L.A., Voronezhskaya E.E. and others.* Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia) // Cell Tiss. Res. 2003. V. 311. P. 259–266.
- Buznikov G.A., Shmukler Y.B.* Possible role of “pre nervous” neurotransmitters in cellular interactions of early embryogenesis: a hypothesis // Neurochem. Res. 1981. V. 6. P. 55–68.
- Carre D., Carre C.* Origin of germ cells, sex determination, and sex inversion in medusae of the genus *Clytia* (Hydrozoa, Leptomedusae): The influence of temperature // J. Exp. Zool. 2000. V. 287. № 3. P. 233–242.
- Chapman D.M.* Microanatomy of the cubopolyp, *Tripedalia cystophora* (Class Cubozoa) // Helgol. Mar. Res. 1978. V. 31. № 1. P. 128–168.
- Chia F.-S., Koss R.* Fine structural studies of the nervous system and the apical organ in the planula larva of the sea anemone *Anthopleura elegantissima* // J. Morphology. 1979. V. 160. № 3. P. 275–297.
- Chourrout D., Delsuc F., Chourrout P. and others.* Minimal ProtoHox cluster inferred from bilaterian and cnidarian Hox complements // Nature. 2006. V. 442. № 7103. P. 684–687.
- Collins A.G., Cartwright P., McFadden C.S. and others.* Phylogenetic context and basal Metazoan model systems // Integr. Comp. Biol. 2005. V. 45. P. 585–594.
- Emanuelsson H.* Localization of serotonin in cleavage embryos of *Ophryotrocha labronica* La Greca and Bacci // Wilhelm Roux' Archiv. 1974. V. 175. P. 253–271.
- Fautin D.G.* Reproduction of Cnidaria // Can. J. Zool. 2002. V. 80. P. 1735–1754.
- Fautin D.G., Mariscal R.N.* Cnidaria: Anthozoa // Harrison F.W., Westfall J.A., editors. Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. New York: Wiley-Liss, Inc. 1991. P. 267–358.
- Finnerty J.R., Pang K., Burton P. and others.* Origins of bilateral symmetry: Hox and dpp expression in a sea anemone // Science. 2004. V. 304. P. 1335–1337.
- Frank U., Leitz T., Muller W.A.* The hydroid *Hydractinia*: a versatile, informative cnidarian representative // Bioessays. 2001. V. 23. № 10. P. 963–971.

- Freeman G., Stocum D.L., Karr T.L. The establishment and role of polarity during embryogenesis in Hydrozoans // The cellular and molecular biology of pattern formation. New York, Oxford: Oxford University Press, 1990. P. 3–30.
- Freeman G., Tardent P., Tardent R. The role of cleavage in the establishment of the anterior-posterior axis of the hydrozoan embryo // Dev. Cell. Biol. Coelenterates. Amsterdam: Elsevier/Horth-Holland Biomedical Press. 1980. P. 97–108.
- Fritzenwanker J.H., Technau U. Induction of gametogenesis in the basal cnidarian *Nematostella vectensis* (Anthozoa) // Dev. Genes Evol. 2002. V. 212. P. 99–103.
- Grimmelikhuijzen C.J. FMRamide immunoreactivity is generally occurring in the nervous systems of coelenterates // Histochemistry. 1983. V. 78. P. 361–381.
- Grimmelikhuijzen C.J.P. Antisera to the sequence Arg-Pheamide visualize neuronal centralization in hydroid polyps // Cell Tiss. Res. 1985. V. 241. P. 171–182.
- Grimmelikhuijzen C.J.P., Graff D., Koizumi O. and others. Neuropeptides in coelenterates: A review // Coelenterate Biology: Recent Research on Cnidaria and Ctenophora, 1991. P. 555–564.
- Gröger H., Schmid V. Larval development in Cnidaria: a connection to Bilateria? // Genesis. 2001. V. 29. № 3. P. 110–114.
- Gröger H., Schmid V. Nerve net differentiation in medusa development of *Podocoryne carnea* // Sci. Mar. 2000. V. 64. P. 107–116.
- Gröndahl F. Evidence of gregarious settlement of planula larvae of the scyphozoan *Aurelia aurita*: an experimental study // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1989. V. 56. P. 119–125.
- Hayward D.C., Miller D.J., Ball E.E. Snail expression during embryonic development of the coral *Acropora*: blurring the diploblast/triploblast divide? // Dev. Genes Evol. 2004. V. 214. № 5. P. 257–260.
- Hobmayer B., Rentzsch F., Kuhn K. and others. WNT signaling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra* // Nature. 2000. V. 407. № 6801. P. 186–189.
- 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 C.N. and others. Control of planula migration by LWamide and RFamide neuropeptides in *Hydractinia echinata* // J. Exp. Zool. 2004. V. 207. P. 1803–1810.
- Kobayashi M., Wada H., Satoh N. Early evolution of the Metazoa and phylogenetic status of diploblasts as inferred from amino acid sequence of elongation factor-1 alpha // Mol. Phylogenet. Evol. 1996. V. 5. № 2. P. 414–422.
- Kozmik Z., Swamynathan S.K., Ruzickova J. and others. Cubozoan crystallins: evidence for convergent evolution of pax regulatory sequences // Evol. Dev. 2008. V. 10. № 1. P. 52–61.
- Kraus Y., Fritzenwanker J.H., Genikhovich G. and others. The blastoporal organiser of a sea anemone // Curr. Biol. 2007. V. 17. № 20. P. 874–876.
- Kroiher M., Plieckert G., Muller W.A. Pattern of cell proliferation in embryogenesis and planula development of *Hydractinia echinata* predicts postmetamorphic body pattern // Roux's Arch. Dev. Biol. 1990. V. 199. P. 156–163.
- Kumburegama S., Wijesena N., Xu R. et al., Strabismus-mediated primary archenteron invagination is uncoupled from Wnt/beta-catenin-dependent endoderm cell fate specification in *Nematostella vectensis* (Anthozoa, Cnidaria): Implications for the evolution of gastrulation // EvoDevo. 2011. V. 2. № 1. P. 2.
- Lesh-Laurie G.E., Suchy P.E. Cnidaria: Scyphozoa and Cubozoa // Harrison F.W., Westfall J.A., editors. Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. New York: Wiley-Liss, Inc., 1991. P. 185–266.
- Marlow H.Q., Srivastava M., Matus D.Q. and others. Anatomy and development of the nervous system of *Nematostella vectensis*, an anthozoan cnidarian // Dev. Neurobiol. 2009. V. 69. № 4. P. 235–254.
- Martin V.J., Chia F.S., Koss R. A fine structural study of metamorphosis of the hydrozoan *Mitrocomella polydiademata* // J. Morphol. 1983. V. 176. P. 261–287.
- Martin V.J. Development of nerve cells in hydrozoan planulae: II. Examination of sensory cell differentiation using electron microscopy and immunocytochemistry // Biol. Bull. 1988. V. 175. P. 65–78.
- Martin V.J. Characterization of a RFamide-positive subset of ganglionic cells in the hydrozoan planular nerve net // Cell Tissue Res. 1992a. V. 269. № 3. P. 431–438.
- Martin V.J. Characterization of a RFamide-positive subset of ganglionic cells in the hydrozoan planular nerve net // Cell Tissue Res. 1992b. V. 269. P. 431–438.
- Martin V.J. Reorganization of the nervous system during metamorphosis of a hydrozoan planula // Invert. Biol. 2000. V. 119. № 3. P. 243–253.
- Martin V.J., Chia F. Fine structure of a scyphozoan planula, *Cassiopeia xamachana* // Biol. Bull. 1982. V. 163. P. 320–328.
- Martindale M.Q., Finnerty J.R., Henry J.Q. The Radiata and the evolutionary origins of the bilaterian body plan // Mol. Phylogenet. Evol. 2002. V. 24. P. 358–365.
- McCauley D.W. Serotonin plays an early role in the metamorphosis of the hydrozoan *Phialidium gregarium* // Dev. Biol. 1997. V. 190. № 2. P. 229–240.
- Medina M., Collins A.G., Silberman J.D. and others. Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA // PNAS. 2001. V. 98. № 17. P. 9707–9712.
- Miller D.J., Ball E.E. The coral *Acropora*: what it can contribute to our knowledge of metazoan evolution and the evolution of developmental processes // Bioessays. 2000a. V. 22. № 3. P. 291–296.
- Miller D.J., Dodd H., Berghammer H. and others. What molecular data tell us about the evolution of the “Coelenterata” // Proceedings of the 6th International Conference on Coelenterate Biology, 1995. 1997. P. 345–351.
- Miller D.J., Hayward D.C., Reece-Hoyes J.S. and others. Pax gene diversity in the basal cnidarian *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa): implications for the evolution of the Pax gene family // PNAS. 2000b. V. 97. № 9. P. 4475–4480.
- Millonig G. Study on the factors which influence preservation of fine structure // Buffa P., editor. Symposium on

- electron microscopy, 1964. Rome, Italy. Consiglio Nazionale delle Ricerche. 1964. P. 347.
- Nakanishi N., Yuan D., Jacobs D.K. and others.* Early development, pattern, and reorganisation of the planula nervous system in *Aurelia* (Cnidaria, Scyphozoa) // *Dev. Genes Evol.* 2008. V. 218. P. 511–524.
- Plickert G., Kroehler M., Munck A.* Cell proliferation and early differentiation during embryonic development and metamorphosis of *Hydractinia echinata* // *Development.* 1988. V. 103. № 4. P. 795–803.
- Schuchert P.* Phylogenetic analysis of the Cnidaria // *Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.* 1993. V. 31. № 3. P. 161–173.
- Seipel K., Schmid V.* Evolution of striated muscle: Jellyfish and the origin of triploblasty // *Dev. Biol.* 2005. V. 282. № 1. P. 14–26.
- Seipp S., Schmich J., Kehrwald T. and others.* Metamorphosis of *Hydractinia echinata* – natural versus artificial induction and developmental plasticity // *Dev. Genes Evol.* 2007. V. 217. № 5. P. 385–394.
- Seipp S., Schmich J., Leitz T.* Apoptosis – a death-inducing mechanism tightly linked with morphogenesis in *Hydractinia echinata* (Cnidaria, Hydrozoa) // *Development.* 2001. V. 128. № 23. P. 4891–4898.
- Seipp S., Schmich J., Will B. and others.* Neuronal cell death during metamorphosis of *Hydractinia echinata* (Cnidaria, Hydrozoa) // *Invert. Neurosc.* 2010. V. 10. № 2. P. 77–91.
- Sommer C.* Post-embryonic larval development and metamorphosis of the hydroid *Eudendrium racemosum* (Cavolini) (Hydrozoa, Cnidaria) // *Helgol. Meeresunters.* 1990. V. 44. № 3–4. P. 425–444.
- Spencer A.N.* Peptides in the Hydrozoa: are they transmitters? // *Hydrobiologia.* 1991. V. 216/217. P. 565–571.
- Walther M., Ulrich R., Kroehler M. and others.* Metamorphosis and pattern formation in *Hydractinia echinata*, a colonial hydroid // *Int. J. Dev. Biol.* 1996. V. 40. № 1. P. 313–322.
- Weis V.M., Keene D.R., Buss L.W.* Biology of the hydractiniid hydroids. 4. Ultrastructure of the planula of *Hydractinia echinata* // *Biol. Bull.* 1985. V. 168. P. 403–418.
- Yuan D., Nakanishi N., Jacobs D.K. and others.* Embryonic development and metamorphosis of the scyphozoan *Aurelia* // *Dev. Genes Evol.* 2008. V. 218. P. 525–539.
- Zega G., Pennati R., Fanzago A. and others.* Serotonin involvement in the metamorphosis of the hydroid *Eudendrium racemosum* // *Int. J. Dev. Biol.* 2007. V. 51. № 4. P. 307–313.

On Some Features of Embryonic Development and Metamorphosis of *Aurelia Aurita* (Cnidaria, Scyphozoa)

T. D. Maiorova, I. A. Kosevich, and O.P. Melekhova

Biological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia
e-mail: ikosevich@gmail.com

Abstract—*Aurelia aurita* is a cosmopolite species of scyphomedusae. Its major structural patterns and life cycle are well investigated. This work provides a detailed study on development and structure of the planula in *A. aurita* until it completes its metamorphosis. Lifetime observations and histological study performed during the settlement and metamorphosis of the planulae demonstrated that the inner manubrium lining of primary polyp (gastroderm) develops from the ectoderm of the planula posterior end. The spatial and temporal dynamics of serotonergic cells from the early embryonic stages until the formation of the primary polyp were studied for the first time. In addition, the distribution of tyrosinated tubulin and neuropeptide RFamide at different stages of *A. aurita* development were studied.

Keywords: ontogenesis, metamorphosis, nervous system, Scyphozoa, *Aurelia aurita*