———— МОРФОГЕНЕЗ ——

УДК 591.341.2:591.393

РАННИЕ ПЕРИФЕРИЧЕСКИЕ СЕНСОРНЫЕ НЕЙРОНЫ В РАЗВИТИИ ТРОХОФОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

© 2017 г. Л. П. Незлин*, Е. Е. Воронежская

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН 119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26 *E-mail: nezlinl@mail.ru Поступила в редакцию 09.05.2016 г. Окончательный вариант получен 05.09.2016 г.

У трохофорных животных, имеющих бифазный пелаго-бентический жизненный цикл, нейрогенез личиночной стадии начинается с дифференцировки ранних периферических нейронов, которые являются транзиторными и не входят в состав центральной нервной системы. Ранние нейроны локализованы чаще всего в апикальном сенсорном органе и в гипосфере. В случае, когда отростки нейронов образуют остов, вдоль которого затем формируется ЦНС взрослого животного, они являются пионерными. Иммунохимическое маркирование ранних нейронов у ряда видов моллюсков и полихет антителами против нейромедиаторов серотонина и FMRFамида в сочетании с антителами против ацетилированного α-тубулина показало, что практически все ранние периферические нейроны имеют строение, характерное для сенсорных (вероятно хемосенсорных) нейронов: булавовидная форма, апикальный дендрит, выходящий на поверхность тела и имеющий терминальное утолщение, а также реснички на конце дендрита или в ампульной полости. Локализация, форма и медиаторная специфичность ранних сенсорных клеток и ход их отростков различаются у трохофор разных видов. Подавление синтеза серотонина в ранних нейронах у личинок полихет фармакологическими препаратами не влияло на развитие, в то время как усиление синтеза приводило к торможению развития и нарушению морфологии формирующейся нервной системы. Это свидетельствует об участии ранних периферических сенсорных нейронов в регуляции нейрогенеза и темпов развития.

Ключевые слова: Trochozoa, трохофора, сенсорные нейроны, пионерные нейроны, апикальный сенсорный орган, 5-HT, FMRFamide, тубулин, регуляция развития **DOI:** 10.7868/S0475145017020069

введение

Подавляющее большинство водных беспозвоночных животных имеет бифазный пелаго-бентический жизненный цикл, в котором имагинальной стадии предшествует свободно плавающая или инкапсулированная личинка. Личинки предназначены для расселения и обычно имеют короткую по сравнению с имагинальной стадией продолжительность жизни и упрощенное строение. Простота организации делает личинок удобным объектом для сравнительно-морфологических и филогенетических исследований, при этом, их "простые" нервные системы, состоящие иногда из нескольких десятков клеток, позволяют изучать фундаментальные процессы развития нервной системы на уровне одиночных нейронов (см. обзор Croll, 2000; Nezlin, 2010; Voronezhskaya, Ivashkin, 2010).

Преимущества простых нервных систем в сочетании с современными методами визуализации нейрональных элементов (флуоресцентная иммуноцитохимия и лазерная сканирующая микроскопия) позволили по-новому взглянуть на закладку нервной системы у представителей трохофорных животных различных таксономических групп. Было показано, что самые первые нейроны в развитии пресноводного легочного моллюска *Lymnaea stagnalis* дифференцируются на периферии в задней части зародыша, а их идущие вперед отростки образуют остов, вдоль которого впоследствии формируется дефинитивная нервная система (Croll, Voronezhskaya, 1996; Voronezhskaya, Elekes, 1996).

Проведенные в дальнейшем исследования по раннему нейрогенезу ряда видов моллюсков и полихет с использованием иммунохимического маркирования антителами против нейромедиаторов серотонина (5-НТ) и нейропептида FMRFамида (FMRFa), а также ацетилированного тубулина показали, что у всех исследованных животных нейрогенез начинается с ранних периферических нейронов, которые не входят в состав центральной нервной системы, а отростки некоторых из этих нейронов образуют остов, вдоль которого затем формируется ЦНС взрослого постметаморфного животного, что позволяет считать такие нейроны пионерными (Bentley, Keshishian, 1982). При этом, число, расположение и химическая специфичность ранних нейронов у разных видов отличаются.

Анализ литературных данных позволяет выделить три области, в которых у личинок моллюсков и полихет появляются ранние нейроны – это апикальная область, где формируется апикальный сенсорный орган (АСО), области эписферы, приближенные к прототроху, и каудальная зона (область телотроха), где в основном локализованы тела пионерных нейронов. Так, например, у брюхоногих моллюсков из различных подклассов: Crepidula fornicata (Prosobranchia), Aplysia californica (Opisthobranchia), L. stagnalis и Biomphalaria glabarus (Pulmonata), ранние нейроны FMRFaергические и расположены в каудальной области (Croll and Voronezhskaya, 1995, 1996; Voronezhskaya, Elekes, 1996; Dickinson et al., 1999, 2000). У трохофоры хитона Ischnochiton hakodadensis (Mollusca. Polyplacophora) ранние FMRFa-ергические нейроны появляются в латеральных и дорзальной областях эписферы, а 5-HT-ергические в ACO (Voronezhskava et al., 2002). У личинок мидии Mytilus trossulus (Mollusca, Bivalvia) все ранние нейроны появляются исключительно в эписфере. При этом часть из них впоследствии формирует АСО, а идущие назад отростки латерально расположенных клеток маркируют остов будущей ЦНС (Voronezhskava et al., 2008). Похожий порядок появления ранних нейронов и у лопатоного моллюска Antalis entalis (Mollusca, Scaphopoda): тела первых 5-НТ- и FMRFa-иммунопозитивных нейронов, в эписфере, и идущие назад FMRFa-иммунопозитивные отростки в местах будущего расположения висцеральной части нервной системы (Wanninger, Haszprunar, 2003).

Нейрогенез аннелид – второй крупнейшей группы трохофорных животных — изучен значительно хуже. Однако имеющиеся данные позволяют также отметить разнообразие в паттерне ранних периферических нейронов. У Phyllodoce maculata (Polychaeta, Phyllodocidae) первый нейрон 5-НТ-ергический и появляется на заднем конце тела. Затем к нему добавляются три FMRFa-ергических нейрона (один на вентральной стороне и два каудальных), а также 5-НТ- и FMRFa-ергические нейроны в АСО. При этом, отростки апикальных нейронов в построении остова будущей ЦНС не участвуют (Voronezhskaya et al., 2003). У представителя другого семейства из того же отряда Phyllodociformes Platynereis dumerilii (Polychaeta, Nereididae) первый нейрон в личиночном paзвитии появляется, как и у *P. maculata*, каудально. Однако он иммунореактивен к антителам и против 5-HT, и против FMRFa. Затем появляются FMRFa-ергические нейроны дорзально и латерально в эписфере, а также 5-НТ- и FMRFa-ергические нейроны в ACO. Все они участвуют в построении остова будущей ЦНС (Starunov et al., 2017). У представителя рода сабеллид Sabellaria alveolata (Polychaeta, Sabellidae) 5-НТ- и FMRFaергические нейроны обнаруживаются в эписфере и их отростки участвуют в формировании основных нервных структур личинки: кольцевого нерва прототроха, околоротового нерва, парных вентральных стволов и апикального кругового нерва (Brinkmann, Wanninger, 2008). У *Capitella teleta* (Polychaeta, Capitellidae), в чьем развитии отсутствует трохофора, ранние периферические нейроны вообще не обнаружены, и первые нервные элементы появляются в головном ганглии и вентральном нервном стволе (Meyer et al., 2015).

То, что в онтогенезе всех изученных до настоящего времени представителей трохофорных животных, в развитии которых имеется стадия трохофоры, всегда присутствуют ранние периферические нейроны, заставляет предположить, что они имеют сходные физиологические и/или морфогенетические функции. При этом, гомологичность ранних нейронов проблематична, поскольку у разных видов они возникают, скорее всего, из разных зон презумптивной эктодермы и имеют разную химическую специфичность. Гомологичность можно предполагать лишь для нейронов АСО, который ранее подробно изучался морфологами (литературу см. в Nezlin, Starunov, 2017). В последнее время это предположение подтверждено молекулярно-генетическими данными (Marlow et al., 2014). Функции АСО в развитии трохофорных животных до сих пор не ясны, однако его строение позволило предположить, что он участвует в восприятии сигналов из окружающей среды при локомоции, питании и метаморфозе (Bonar, 1978; Chia, Koss, 1984; Kempf et al., 1997; Marois, Carew, 1997). Кроме того, эксперименты на голожаберном моллюске Phestilla sibodae показали, что ACO у готовых к метаморфозу личинок воспринимает растворенные в воде вещества, стимулирующие метаморфоз (Hadfield et al., 2000). Между тем, функции нейронов АСО на ранних стадиях развития остаются неизвестными, хотя у пресноводных легочных моллюсков L. stagnalis и Helisoma trivolvis было показано участие апикальных нейронов личинок в регуляции темпов развития (Voronezhskava et al., 2004, 2008) и роль смены паттерна экспрессии различных рецепторов серотонина в реализации функций нейронов АСО на разных стадиях личиночного развития (Glebov et al., 2014).

Можно предположить, что не только нейроны ACO, но и другие ранние периферические нейроны у этих и других видов трохофорных животных также участвуют в управлении развитием, воспринимая сигналы из внешней среды. В этом случае, они должны иметь морфологические характеристики, предполагающие их сенсорную природу, а фармакологическое воздействие на содержание в

них медиатора должно приводить к определенным изменениям в личиночном развитии. Иммунохимическое маркирование антителами против нейромедиаторов 5-НТ или FMRFa в сочетании с антителами против ацетилированного α-тубулина позволяет не только локализовать нейроны соответствующей медиаторной специфичности, но и определить их детальную морфологию, поскольку, маркируя нейротубулы и элементы цитоскелета, антитела против тубулина выявляют отростки нейронов и ресничные структуры. Кроме того, поскольку эти антитела выявляют отростки всех нейронов независимо от их медиаторной специфичности, появляется возможность убедиться, что других нейронов на данной стадии развития еше нет.

Целью нашей работы было детальное иммуноцитохимическое изучение строения ранних периферических нейронов у личинок следующих видов трохофорных животных: I. hakodadensis (Mollusca: Polyplacophora), M. trossulus и Crassostrea gigas (Mollusca: Bivalvia), Tritonia diomedea (Mollusca: Nudibranchia), L. stagnalis (Mollusca: Pulmonata), P. maculata (Annelida: Polychaeta). Использовали описанную выше комбинацию антител и лазерный сканирующий микроскоп, что позволило получать трехмерные изображения нейронов и детально анализировать их морфологию. Показано, что практически все ранние периферические нейроны, как в АСО, так и вне его, имеют четкие морфологические признаки, характерные для сенсорных (вероятнее всего хемосенсорных) нейронов, а именно, апикальный дендрит, выходяший на поверхность и обычно несуший поверхностные реснички.

Для экспериментов по изучению возможного участия ранних сенсорных нейронов в управлении развитием были выбраны личинки полихет *P. maculata* и *P. dumerilii*, поскольку у этих видов первый периферический сенсорный нейрон содержит 5-HT, а значит, на его функциональную активность можно направленно фармакологически воздействовать, блокируя 5-HT рецепторы или меняя уровень его синтеза инкубацией в биохимическом предшественнике или ингибиторе синтеза (Diefenbach et al., 1995; Yaguchi and Katow, 2003; Voronezhskaya et al., 2004). После инкубации личинок фиксировали для последующей иммунохимической реакции на 5-HT, FMRFa и α-тубулин.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объекты и стадии развития. Развивающиеся зародыши легочных моллюсков *H. trivolvis* и *L. stagnalis*, а также полихеты *P. dumerilii* были получены от животных из лабораторных культур, содержащихся в ИБР РАН. Личинок морских моллюсков *C. gigas*, *M. trossulus*, *I. hakodadensis*, *T. diomedea* и полихеты *P. maculata* получали от животных, выловленных в

ОНТОГЕНЕЗ том 48 № 2 2017

море и содержащихся в аквариумах. Детали содержания животных, получения личинок, их анестезирования и фиксации описаны ранее (Voronezhskaya et al., 2002, 2003, 2004, 2008; Buznikov et al., 2003). Для иммунохимического изучения использовались трохофоры и велигеры моллюсков и трохофоры полихет. Стадии развития личинок определяли по совокупности морфологических, морфометрических и поведенческих признаков, как описано в процитированных выше работах.

Иммунохимическое маркирование. Личинок анестезировали в 7% водном растворе хлорида магния и фиксировали 4-6 ч при 4°С в свежеприготовленном 4% параформальдегиде на 0.1 М фосфатном буфере (ФБ, рН 7.4). Затем препараты отмывали в ΦE (3 × 15 мин), поэтапно переводили в 70% этанол (через 30 и 50%) и хранили при -20°С. Для проведения иммунохимической реакции личинок приводили к комнатной температуре и отмывали в ФБ. Неспецифическое связывание блокировали в растворе 10% нормальной козьей сыворотки, 0.25% бычьего сывороточного альбумина, 1% Triton X-100 и 0.03% азида натрия в ФБ в течение ночи. Затем личинок инкубировали в смеси первичных антител, включающей анти-5-НТ или анти-FMRFa антитела (поликлональные, выработаны в кролике. Immunostar. США. № 20080 и 20091, разведение 1 : 2000-1 : 3000) и антитела против ацетилированного α-тубулина (моноклональные, выработаны в мыши, Sigma, США, № Т-6793, разведение 1 : 1000-1 : 1500) в блокирующем растворе 2-4 дня при 4°С. Затем препараты отмывали в ФБ и инкубировали 2–4 ч при комнатной температуре в смеси вторичных антител, содержащей goat anti-rabbit Alexa 488 IgG и goat anti-mouse Alexa 546 IgG в ФБ. Препараты отмывали в ФБ и монтировали на предметные стекла в 80% глицерин или TDE и изучали в лазерном сканирующем конфокальном микроскопе TCS SP5. TCS SPE (оба Leica, Германия), или LSM-510 (Zeiss, Германия). Из серий оптических срезов получали проекции в режиме Full Focus и экспортировали их как TIFF файлы. Дальнейшую обработку вели в программе Photoshop CS2 (Adobe, США). Изображения конвертировали в негативы, так что иммунохимическое маркирование 5-HT и FMRFa представлено черным, а α-тубулин фиолетовым. Затем корректировали яркость и контрастность и монтировали отдельные изображения в блоки.

Фармакологические эксперименты. Порезанные на куски длиной 4–6 см яйцевые коконы *P. maculata* или развивающиеся яйца *P. dumerilii* помещали в 25 мл чашки Петри (2–4 зародыша/мл) и инкубировали при 20°С в свежеприготовленных растворах следующих веществ (все Sigma-RBI, США) в фильтрованной морской воде: антагонист рецепторов серотонина широкого спектра действия миансерин (mianserin hydro-

chloride), серотонин (5-hydroxytryptamine creatine sulfate, 5-HT), метаболический предшественник синтеза серотонина 5-hydroxy-L-tryptophan (5-НТР), селективный ингибитор синтеза серотонина парахлорфенилаланин (L-p-chlorophenylalanine, PCPA), FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe amide). Для стабилизации растворов в них добавляли 50 мкМ аскорбиновой кислоты. Растворы меняли ежедневно. Действующие концентрации подбирали в предварительных экспериментах так, чтобы максимальная концентрация не оказывала токсического эффекта (смертность была менее 50%). Зародышей инкубировали, начиная со стадии 64 бластомера до появления пигмента в глазах у контрольных, развивающихся в морской воде личинок *P. maculata* (стадия средней трохофоры) или до появления ресничного паратроха у контрольных личинок *P. dumerilii* (стадия ранней метатрохофоры). В обоих случаях, время инкубации составляло 40-46 ч. Затем личинок фиксировали и проводили выявление 5-HT, FMRFa и тубулина, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сенсорная природа ранних периферических нейронов

Mollusca: Polyplacophora (I. hakodadensis). В онтогенезе хитона первые клетки, иммунореактивные к антителам против 5HT и FMRFa (5-HT-ИР и FMRFa-ИР), появляются на стадии ранней трохофоры (24-30 ч после оплодотворения) и все они расположены в эписфере. К ним относятся 18 5-НТ-ИР нейронов: 10 под апикальным султанчиком в АСО, 4 на дорзальной и 4 на вентральной стороне эписферы (рис. 1a), 10 FMRFa-ИР нейронов: три пары в АСО и четыре нейрона на дорзальной стороне (рис. 1д), а также две пары латеральных клеток, иммунореактивных и к 5-НТ, и к FMRFa (рис. 1г) (см. также Voronezhskava et al., 2002). Все эти нейроны имеют строение, характерное для сенсорных нейронов, за исключением двух 5-НТ-ИР и двух FMRFa-ИР клеток по бокам нейропиля в АСО, которые появляются несколько позже. Так, нейроны в АСО и дорзальные нейроны имеют булавовидную форму, базальные отростки, идущие в нейропиль, и апикальные отростки, идущие на поверхность и оканчивающиеся терминальным утолщением (рис. 1б). Две пары 5-НТ-ИР и FMRFa-ИР латеральных клеток имеют в дистальной части компактную ампулу с тубулин-позитивным содержимым (рис. 1в, 1е, 1ж).

Mollusca: Bivalvia (*M. trossulus* и *C. gigas***)**. Поскольку различия между видами невелики, мы описываем их вместе. Появление ранних нейронов у *M. trossulus* было описано нами ранее (Voronezhskaya et al., 2008). У обоих видов все ранние нейроны появляются на стадии трохофоры на апикальном конце тела в области ACO. К стадии поздней трохофоры в основании ACO выявляются три—четыре 5-НТ-ИР клетки и каждая имеет короткий апикальный дендрит, который несет на апикальном конце пучок коротких ресничек (рис. 2a-2r). Различия между видами состоят лишь в том, что у *M. trossulus* эти клетки округлой формы, а у *C. gigas* они имеют выраженную булавовидную форму (рис. 26, 2r).

FMRFa-ИР ранние клетки у обоих видов появляются последовательно: сначала на стадии ранней трохофоры появляется одна клетка в ACO, затем еще три, причем, расположенные латерально клетки смещаются вниз и назад, а их базальные отростки маркируют остов будущей ЦНС, что позволяет считать их пионерными. К стадии поздней трохофоры в ACO появляются еще две клетки и все шесть FMRFa-ИР клеток имеют короткие апикальные дендриты и поверхностные реснички, характерные для сенсорных клеток (рис. 2д–2з).

Mollusca: Gastropoda (T. diomedea и L. stagnalis). В развитии голожаберного моллюска T. diomedea первые клетки с признаками нейронов появляются на стадии трохофоры – раннего велигера. Ранее в литературе были описаны пять 5-НТ-ИР клеток, которые расположены в АСО. Три из них булавовидные с апикальными сенсорными отростками, а две несенсорные (Kempf et al., 1997). Две пары FMRFa-ИР клеток располагаются в задней части зародыша. Одна пара расположена вентрально недалеко от зачатка раковины, а другая смещена вперед и латерально (рис. 3а, 3б). Каждая из задних FMRFa-ИР клеток биполярна, длинный отросток идет вперед в апикальную область, короткий отросток выходит на поверхность и несет пучок длинных ресничек (рис. 3в, 3г).

У эмбрионов прудовика L. stagnalis на стадиях, соответствующих трохофоре и велигеру, выявляются две клетки в апикальной области, проявляющие иммунореактивность к пептидам семейства RFамида, тирозингидроксилазе (ферменту синтеза катехоламинов) и 5-НТ; а также 3-4 FMRFa-ИР клетки в задней полусфере (Croll, Voronezhskaya, 1996; Croll, 2000). Апикальные клетки булавовидной формы имеют короткий дендрит, выходящий на поверхность и несущий щеточку коротких ресничек (Voronezhskaya et al., 2004). В задней полусфере расположена каудальная клетка в зоне формирования раковины и пара латеральных клеток (рис. 3д). Каудальных клеток может быть одна или две (рис. 3е, 3ж). Каудальные клетки всегда триполярны, их базальные отростки участвуют в создании остова будущей ЦНС, а короткий апикальный отросток выходит на поверхность и несет щеточку коротких ресничек (рис. 33). Латеральные клетки расположены справа и слева приблизительно в средней части тела эмбриона и имеют характерную звездчатую форму.



Рис. 1. Ранние сенсорные нейроны у трохофоры хитона *I. hacodadensis*. Иммунохимическое маркирование 5-HT и FMRFa представлено черным, а α -тубулин фиолетовым. (a–в) – 5-HT-ИР нейроны. (a) – средняя трохофора, апикальные нейроны в ACO (*aн*), группа дорзальных нейронов (*дн*), группа вентральных нейронов (*вн*) и пара латеральных пионерных нейронов (*лн*) (вид с латеральной стороны). (б) – апикальная область на большом увеличении. У апикальных и дорзальных нейронов видны апикальные дендриты с утолщениями на конце (стрелки). Вставка: апикальный дендрит дорзального нейрона несет поверхностные реснички (стрелка). (в) – пара ампулярных латеральных нейронов с ампулами в апикальной части (стрелки). (г–е) – FMRFa-ИP нейроны. (г) – ранняя трохофора, две пары латеральных нейронов (*лн*) (вид с вентральной стороны). (д) – средняя трохофора, апикальные нейроны (*aн*), дорзальные нейроны (*дн*) и латеральные нейроны (*лн*). (е) – латеральные нейроны на большом увеличении идентичны клеткам, показанным на (в). (ж) – те же клетки, по-казаны только α -тубулин-ИP структуры. Ампулы заполнены тубулин-позитивным материалом (стрелки); *ac* – апикальные нейки: (а) и (г) – 50 мкм, остальные – 10 мкм.

У них не обнаружено отростков, выходящих на поверхность и несущих реснички (рис. 3и).

Апnelida: Polychaeta (*P. maculata*). Первые нейроны появляются примерно за сутки до вылупления трохофоры из яйцевых оболочек. Вначале появляется одиночная 5-НТ-ИР клетка на заднем конце тела (рис. 4а), затем к ней добавляются два периферических 5-НТ-ИР нейрона на дорзальной стороне (рис. 4б, 4в), а незадолго до вылупления появляются нейроны в АСО: один 5-НТ-ИР (рис. 4г) и четыре FMRFa-ИР (рис. 4д), а также один вентральный и два каудальных периферических FMRFa-ИР нейрона (рис. 4д) (см. также Voronezhskaya et al., 2003). Все эти ранние нейроны имеют характерное для сенсорных клеток строение (рис. 4е). Так, и первая каудальная, и обе дорзальные 5-НТ-ИР клетки имеют направленный к поверхности дендрит, на котором расположены короткие реснички (рис. 4а–4в). Первый 5-НТ-ИР нейрон в АСО также имеет строение, характерное для сенсорных клеток: булавовидную форму и короткий, лишенный поверхностных ресничек апикальный дендрит с утолщением на конце (рис. 4г). Лишь после вылупления личинки в АСО появляется несколько 5-НТ-ИР нейронов, у которых отсутствуют признаки сенсорных: их сома имеет округлую форму, и единственный базальный отросток идет в нейропиль АСО (рис. 4г).

Все вышеперечисленные FMRFa-ИР клетки также имеют строение, характерное для сенсорных



Рис. 2. Ранние сенсорные нейроны у трохофор двустворчатых моллюсков *C. gigas* и *M. trossulus*. Иммунохимическое маркирование 5-HT и FMRFa представлено черным, а α -тубулин фиолетовым. (а, б) – *C. gigas*, первые 5-HT-ИР нейроны в ACO трохофоры. (а) – общий вид; стрелки указывают на апикальные нейроны; *ac* – апикальный султанчик ресничек, *nm* – прототрох. (б) – апикальный нейрон на большом увеличении. Апикальный дендрит несет поверхностные реснички (стрелка). (в, г) – *M. trossulus*, первые 5-HT-ИР нейроны в ACO трохофоры. (в) – общий вид; стрелки указывают на апикальные нейроны: (в, г) – *M. trossulus*, первые 5-HT-ИР нейроны в ACO трохофоры. (в) – общий вид; стрелки указывают на апикальные нейроны. (г) – апикальный нейрон на большом увеличении. Апикальный дендрит несет поверхностные реснички (стрелка). (д–3) – первые FMRFa-ИР нейроны у *M. trossulus* (с*. gigas*. (д) – четыре сенсорных нейрона с апикальными ресничками в эписфере ранней трохофоры *M. trossulus* (стрелки). (е) – средняя трохофора *C. gigas*: четыре апикальных нейрона (*стрелки*) и два пионерных нейрона на вентральной стороне (жирные стрелки). На большом увеличении видно, что апикальные нейроны (ж) и вентральные пионерные нейроны (3) имеют дендриты с поверхностными ресничками (стрелки). Масштабные линейки – 10 мкм.

нейронов. Все четыре нейрона в ACO имеют по одному короткому апикальному лишенному ресничек дендриту с утолщением на конце (рис. 4е). Вентральная клетка имеет два дендрита, каждый из которых выходит на поверхность и несет по пучку ресничек (рис. 4ж), а оба каудальных нейрона имеют по одному дендриту вооруженному ресничками (рис. 43).

Фармакологическая модуляция развития

Р. maculata. На момент фиксации (47–53 ч после оплодотворения) контрольные личинки *Р. maculata* были в длину 120–140 мкм и имели хорошо развитый замкнутый прототрох, состоящий из ресничек длиной 20–25 мкм, апикальный султанчик ресничек длиной 33–35 мкм, а также реснички в ротовом отверстии (рис. 5а). Выявлялись следующие 5-НТ-ИР клетки: шесть в АСО, две на меридианальных нервах в эписфере, две на дорзальной стороне личинки в области прототроха, восемь– десять клеток вокруг рта и две клетки на заднем конце личинки. Отростки этих клеток проходили в шести меридианальных нервах в эписфере, кольцевом нерве прототроха, околоротовом нерве и парных вентральных стволах (рис. 5а).

После инкубации в растворе 100 мкМ миансерина личинки ничем не отличались от контроля,



Рис. 3. Ранние сенсорные нейроны у брюхоногих моллюсков. Иммунохимическое маркирование 5-НТ и FMRFa представлено черным, а α -тубулин фиолетовым. (a–г) – две пары задних FMRFa-ИР пионерных нейронов у раннего велигера *T. diomedea*. Одна пара расположена вентрально (стрелки), а другая смещена латерально (жирные стрелки); вид с вентральной стороны (а) и латеральной стороны (б). На большом увеличении видно, что нейроны вентральной пары (г) несут поверхностные реснички (стрелки). (d–и) – задние FMRFa-ИР пионерных нейроны вентральной пары (в) и нейрон латеральной пары (г) несут поверхностные реснички (стрелки). (d–и) – задние FMRFa-ИР пионерные нейроны у трохофоры *L. stagnalis*. (d) – общий вид, показывающий каудальный нейрон (стрелка) и один из двух латеральных нейронов (жирная стрелка). Каудальных нейронов может быть один (е) или два (ж) и они всегда имеют кроме базальных отростков (стрелки) апикальный отросток с пучком коротких ресничек (жирная стрелка) (3). (u) – 100 мкм, остальные – 10 мкм.

более высокие концентрации (200 и 500 мкМ) были токсичными. Инкубация в РСРА приводила к концентрационно-зависимому ослаблению иммунореакции в нервных структурах, однако внешне личинки не отличались от контрольных (рис. 5б). Так, после инкубации в 10 мкМ РСРА уменьшалось количество 5-НТ-ИР клеток, ассоциированных с АСО, исчезла реакция в клетках вокруг рта, а реакция в двух дорзальных клетках и нервах была значительно слабее (рис. 5б). В концентрации 20 мкМ личинки также не отличались от контрольных (рис. 5в), но иммунореакция практиче-

30

ски исчезла везде кроме двух каудальных клеток и двух клеток в АСО (рис. 5в).

Инкубация в 5-НТР приводила к торможению развития. После инкубации в 0.5 мМ личинки были в длину незначительно меньше (110—120 мкм) и имели незамкнутый прототрох (длина ресничек 10—15 мкм) и апикальный пучок ресничек длиной 30—35 мкм, но не имели ресничного пятна в ротовом отверстии (рис. 5г). Этот набор признаков соответствует более ранней стадии развития, нежели контроль. Иммунореактивность к 5-НТ проявлялась ярко в одной каудальной клетке, которую

НЕЗЛИН, ВОРОНЕЖСКАЯ



Рис. 4. Ранние сенсорные нейроны у полихеты *Р. maculata*. Иммунохимическое маркирование 5-НТ и FMRFa представлено черным, а α-тубулин фиолетовым. (a-г) – 5-НТ-ИР нейроны. (a) – ранняя трохофора до вылупления, вид с латеральной стороны, первый каудальный пионерный нейрон (кн), базальные отростки которого обозначают остов будущих вентральных стволов (*вс*) и нерва прототроха (*нп*). Вставка: каудальный нейрон имеет короткий апикальный отросток, несущий две реснички (стрелки). (б) – трохофора сразу после вылупления, к каудальному нейрону добавляются два дорзальных нейрона, каждый из которых имеет апикальный отросток (стрелки). (в) - апикальный отросток дорзального нейрона выходит на поверхность и несет реснички (стрелка). (г) – средняя трохофора, в АСО выявляются три нейрона, два из которых имеют округлую форму и не имеют апикальных отростков (стрелки), а третий имеет булавовидную форму и апикальный отросток (жирная стрелка). Вставка: апикальный отросток оканчивается поверхностным утолщением (стрелка) и не несет ресничек. (д-з) – FMRFa-ИР нейроны. (д) – трохофора после вылупления, вид с вентральной стороны. Показаны четыре апикальных нейрона (стрелки), вентральный нейрон (вн) и два каудальных нейрона (кн). Базальные отростки вентрального и каудальных пионерных нейронов обозначают остов будущего вентрального нервного ствола (вс), нерва прототроха (нп) и околоротового нерва (он), в то время, как отростки нейронов в АСО не выходят за пределы апикального нейропиля (ан). (е) – все апикальные нейроны имеют апикальные дендриты (стрелки). (ж) – вентральный нейрон имеет два базальных отростка (стрелки) и два апикальных отростка, несущие по пучку ресничек (жирные стрелки). (3) - каудальный нейрон имеет базальный отросток (стрелка) и апикальный отросток, несущий пучок ресничек (жирная стрелка); ас – апикальный султанчик ресничек, *пт* – прототрох. Масштабные линейки: 10 мкм.

по форме мы идентифицировали как первый каудальный нейрон (*кн*, рис. 4а), и ее отростках. Кроме того, слабая реакция наблюдалась в одной апикальной и одной дорзальной клетке (рис. 5г). После инкубации в 1 мМ 5-НТР размер личинок был еще меньше (100—115 мкм), прототрох состоял из отдельных пучков коротких ресничек длиной 510 мкм, а апикальный пучок ресничек имел длину 10–15 мкм (рис. 5д), что соответствует еще более ранней стадии развития. Иммунореактивность к 5-НТ выявлялась только в теле одной каудальной клетки и отсутствовала в ее отростках (рис. 5д).

После инкубации в 0.5 и 1 мМ 5-НТ личинки не отличались по размеру от контрольных, но



Рис. 5. Трохофоры *P. maculata* после фармакологической модуляции уровня синтеза серотонина. Иммунохимическое маркирование 5-НТ (черный) и α -тубулина (фиолетовый). Вид с вентральной стороны; (а) – контроль. Трохофора имеет развитую нервную систему и характерный набор ресничных структур: *ac* – апикальный султанчик ресничек; *nm* – прототрох; *po* – реснички в ротовом отверстии. Присутствуют все 5-НТ-ИР нейроны, характерные для трохофоры этой стадии (см. Voronezhskaya et al., 2003). (б) – инкубация в 10 мкМ РСРА. Внешне трохофора не отличается от контроля. Количество 5-НТ-ИР нейронов меньше, чем в контроле, а реакция слабее. (в) – инкубация в 20 мкМ РСРА. Внешне трохофора не отличается от контроля, но количество 5-НТ-ИР клеток еще меньше, а реакция едабее. (г) – инкубация в 0,5 мМ 5-НТР. Трохофора выглядит менее развитой, выявляются три 5-НТ-ИР нейрона: первый каудальный нейрон (*кн*) и две клетки со слабой реакцией (стрелки). (д) – инкубация в 1 мМ 5-НТР. Трохофора выглядит менее развитой, с) – инкубация в 1 мМ 5-НТР. Трохофора выглядит менее развитой, выявляются три 5-НТ-ИР нейрона: первый каудальный нейрон (*кн*). (е) – инкубация в 1 мМ 5-НТР. Трохофора выглядит менее развитой с), выявляется от контроля, выплядит менее развитой, выявляются три 5-НТР. Трохофора выглядит менее развитой, с), с) – инкубация в 1 мМ 5-НТР. Трохофора выглядит менее развитой, выявляются три 5-НТР. Трохофора выглядит менее развитой, с), с) – инкубация в 1 мМ 5-НТР. Трохофора выглядит менее развитой, с), с) – инкубация в 1 мМ 5-НТР. Трохофора выглядит менее развитой, с), с) – инкубация в 1 мМ 5-НТР. Трохофора выглядит менее развитой, в теле наблюдается хаотический спрутинг нервных отростков (стрелки). Выявляются два каудальных и один дорзальный нейрон (стрелки). Масштабные линейки: 10 мкм.

имели незамкнутый прототрох, состоящий из ресничек длиной 20–25 мкм и апикальный султанчик ресничек длиной 33–35 мкм. В теле наблюдался хаотичный спрутинг тубулин-ИР волокон (рис. 5е). Иммунореактивность к 5-НТ выявлялась всего в нескольких клетках и малом количестве отростков (рис. 5е).

Р. dumerilii. На момент фиксации (50–55 ч после оплодотворения) личинки имели продолговатую форму, длину 240–260 мкм, хорошо развитый замкнутый прототрох, состоящий из ресничек длиной 20–25 мкм, ресничные образования в каудальной области (паратрох и телотрох), а также три пары хет. Апикальный султанчик ресничек уже редуцировался (рис. 6а). Имагинальная нерв-

одиннадцать 5-НТ-ИР нейронов (рис. 6а). Раствор миансерина или не влиял на развитие

личинок (20 мкМ), или был токсичен (50 мкМ). Аналогичным образом, раствор РСРА или не влиял на развитие личинок (10 мкМ), или был токсичен (20 мкМ).

ная система была уже хорошо развита и включала

Инкубация в 5-НТР приводила к концентрационно-зависимому замедлению развития. В концентрации 0.5 мМ личинки на момент фиксации находились на стадии ранней трохофоры: они имели округлую форму, длину 180–200 мкм, замкнутый прототрох из ресничек длиной 12–15 мкм, телотрох, состоящий из отдельных пучков ресничек, и апикальный султанчик. Паратрох отсутствовал (рис. 6б). Нервная система соответствовала ста-



Рис. 6. Личинки *P. dumerilii* после фармакологической модуляции уровня синтеза 5-НТ и FMRFa. Иммунохимическое маркирование 5-НТ (черный) и α -тубулина (фиолетовый). Вид с вентральной стороны; (а) – контроль. Метатрохофора имеет характерный набор ресничных структур: na – паратрох; nm – прототрох; me – телотрох; xe – хеты. Присутствуют все 5-НТ-ИР нейроны, характерные для метатрохофоры этой стадии (см. Starunov et al., 2017). (б) – инкубация в 0.5 мМ 5-НТР. Личинка находится на стадии ранней трохофоры; 5-НТ-ИР нейроны соответствуют стадии ранней трохофоры; ac – апикальный султанчик ресничек. (в) – инкубация в 1 мМ 5-НТР. Личинка находится на стадии протрохофоры, выявляются только два 5-НТ-ИР нейрона: каудальный нейрон (κ) и апикальный нейрон (an). (г) – инкубация в 10 мкМ 5-НТ; α -тубулин-ИР структуры демонстрируют хаотичный спрутинг нервных отростков, хотя среди них можно определить вентральные стволы (стрелки) и церебральный ганглий (жирная стрелка); 5-НТ-ИР нейроны выявляются. (д) – инкубация в 50 мкМ 5-НТ; α -тубулин-ИР структуры демонстрируют хаотичный спрутинг спрутин спрутинг без возможности идентифицировать части нервной системы. (е) – инкубация в 100 мкМ FMRFa; личинка не отличается от контрольной. Масштабные линейки: 10 мкм.

дии ранней трохофоры, при этом, все 5-НТ-ИР нейроны выявлялись, хотя интенсивность иммунореакции в некоторых из них была понижена (рис. 6б). В концентрации 1 мМ развитие было практически остановлено: личинки находились на стадии протрохофоры, имели длину 180–190 мкм, апикальный султанчик и незамкнутый прототрох (рис. 6в). Выявлялись только два 5-НТ-ИР нейрона: первый каудальный и первый апикальный (рис. 6в).

Инкубация в растворе 5-НТ приводила к нарушению развития: абнормальному спрутингу нервных отростков (по иммуномечению α-тубулина). Так, в концентрации 10 мкМ личинки, судя по размерам, находились на стадии ранней трохофоры, но не имели развитого прототроха и апикального султанчика, а в их нервной системе присутствовало множество хаотически ветвящихся отростков, хотя контуры церебрального ганглия и вентральных нервных стволов можно было распознать (рис. 6г). В концентрации 50 мкМ наблюдались лишь хаотически ветвящиеся волокна (рис. 6д). Никаких 5-НТ-ИР структур после инкубации в 5-НТ не выявлялось.

После инкубации в растворе FMRFa (10–100 мкМ) личинки не отличались от контрольных ни по общему строению, ни по 5-НТ-ИР нейронам (рис. 6е).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашего исследования показали, что у всех изученных видов трохофорных животных нейрогенез начинается с периферических транзиторных нейронов и на стадии трохофоры (по данным иммунохимического маркирования антителами против 5-HT, FMRFa и α-тубулина) все нейроны за редкими исключениями имеют комплекс признаков, позволяющих считать их сенсорными. Это периферическое расположение, наличие базальных отростков, связывающих его с центральными отделами нервной системы, и апикального дендрита, выходящего на поверхность тела и имеющего терминальное утолщение, а также (не всегда) реснички на конце дендрита или в ампульной полости (в случае латеральных клеток трохофоры хитона). Вероятнее всего, эти клетки являются хемосенсорными, так как они имеют черты, характерные для хемосенсорных нейронов (апикальный дендрит с ресничками на поверхности), и не обладают признаками, характерными для сенсорных нейронов другой модальности (Croll, 1983; Shepperd, 1988).

Локализация, форма и медиаторная специфичность ранних сенсорных клеток и ход их отростков различаются у трохофор разных видов (рис. 7). У трохофоры хитона сначала появляются две пары пионерных нейронов латерально в претрохальной области, а их центральные отростки идут вперед в область будущего церебрального ганглия, проходят в контралатеральную область, поворачивают назад и маркируют зону формирования вентральных нервных стволов. По морфологии эти клетки соответствуют так называемым "ампулярным" сенсорным нейронам, описанным у ряда моллюсков и полихет, у которых дистальная часть заполнена плотно упакованными ресничками (Haszprunar et al., 2002). Чуть позже дифференцируется группа 5-НТ-, и FMRFa-ИР нейронов в апикальной области, отростки которых идут в зону формирования церебрального ганглия (рис. 7а). Таким образом, ранние нейроны у трохофоры хитона – это набор из нескольких десятков периферических сенсорных клеток разного типа: с апикальными ресничками, без ресничек и ампулярные. Следом за ними в основании АСО появляются нейроны без признаков сенсорной модальности.

У двустворчатых моллюсков M. trossulus и C. gigas все ранние нейроны сенсорные и имеют пучки апикальных ресничек (рис. 7б). Все они появляются в эписфере, а затем часть формирует АСО, а одна пара смещается назад и посылает базальные отростки, маркирующие вентральные стволы будущей ЦНС (Voronezhskaya et al., 2008). Между тем, у пресноводного двустворчатого моллюска Dreissena polymorpha, который, в отличие от других пресноводных двустворок, развивается через сталию трохофоры и велигера подобно морским Bivalvia, конфигурация ранних нейронов иная. Самые первые нейроны появляются в АСО, но их отростки не выходят за пределы апикального нейропиля, а остов будущей ЦНС маркирует одиночная сенсорная 5-НТ-ИР клетка, которая появляется позже и расположена вентрально в задней части личинки (Battonyai et al., 2015).

Среди гастропод, у голожаберного моллюска *Т. diomedea* ранние 5-НТ-ИР нейроны в количестве трех сенсорных и двух не сенсорных появляются в ACO, а их базальные отростки не выходят за пределы апикального нейропиля (Kempf et al., 1997). Остов будущей ЦНС очерчивают базальные отростки четырех периферических FMRFa-ИР сенсорных клеток, расположенных в задней части тела и несущих апикальные реснички (рис. 7в). У большого прудовика паттерн пионерных нейронов схож, отличается только число клеток: два 5-НТ-ИР апикальных сенсорных нейрона и три задних FMRFa-ИР клетки (рис. 7г). Однако в отличие от тритонии только у части задних клеток обнаруживаются признаки сенсорной модальности.

У полихет паттерн периферических пионерных нейронов сильно отличается. У *Р. maculata*, который имеет долго живущую в планктоне планктотрофную личинку, все ранние нейроны сенсорные, причем первыми появляются клетки на заднем конце тела, которые маркируют остов будущей ЦНС, а потом к ним присоединяются нейроны в АСО. Самый первый нейрон расположен строго каудально, иммунореактивен к серотонину и несет апикальные реснички, а его базальные отростки маркируют вентральные стволы и нерв прототроха. Затем к нему добавляются еще два 5-НТ-ИР и три FMRFa-ИР нейрона, отростки которых также маркируют области формирования ЦНС. Все они сенсорные и расположены в задней половине тела (рис. 7д). Появляющиеся в это время нейроны в АСО, как и у гастропод, не посылают отростки за пределы апикальной области. Таким образом, у *P. maculata* все обнаруженные у трохофоры 5-НТ-ИР и FMRFa-ИР нейроны сенсорные. У близкого вида Р. dumerilii, имеющего коротко живущую лецитотрофную личинку, паттерн пионерных нейронов несколько отличается (Starunov et al., 2017). Так же, как у филлодоце, все начинается с появления каудального сенсорного нейрона, но он иммунореактивен и к 5-HT, и к FMRFa. Дорзальные 5-HT-ИР клетки и задние FMRFa-ИР клетки отсутствуют, зато в построении остова будущей ЦНС участвуют апикальные и латеральные клетки, две из которых не имеют признаков сенсорных (рис. 7е).

Сравнение полученных результатов позволяет сделать два вывода. Во-первых, значительные отличия в числе, расположении, морфологии и медиаторной специфичности ранних периферических нейронов у разных видов заставляют предположить, что эти нейроны не гомологичны. Во-вторых, то, что у трохофорных животных с разными типами развития (свободноплавающая или инкапсулированная личинка, планктотрофная или лецитотрофная трохофора) нейрогенез всегда начинается с периферических нейронов с признаками сенсорной модальности, заставляет предположить,



Рис. 7. Схема расположения ранних периферических сенсорных нейронов у представителей Trochozoa: *I. hacodadensis* (a), *C. gigas* и *M. trossulus* (б), *T. diomedea* (в), *L. stagnalis* (г), *P. maculata* (д) и *P. dumerilii* (е). Относительные размеры не соблюдены. Вид с вентральной стороны. В каждой паре слева схема 5-НТ-ИР нейронов, а справа FMRFa-ИР нейронов. Объяснение см. в тексте.

что функции этих нейронов схожи и вероятнее всего связаны с модуляцией программы развития.

Ранее, на основании сравнительного иммунохимического изучения нейрогенеза различных представителей трохофорных животных мы предположили, что базовый сценарий закладки нервной системы состоит из следующих этапов: сначала дифференцируются периферические пионерные нейроны, отростки которых формируют остов, вдоль которого впоследствии будет формироваться дефинитивная нервная система. Затем формируется личиночная нервная система, организация которой коррелирует с типом личиночного развития: у планктотрофных личинок с длительным ларвальным периодом она устроена сложнее, чем у лецитотрофных. АСО есть всегда, а значит, является неотъемлемой частью личиночной нервной системы. Затем вдоль путей, проложенных пионерными нейронами, начинает формироваться дефинитивная нервная система, личинка вступает в метаморфоз и превращается в ювенильное животное. Пионерные нейроны исчезают, а личиночная нервная система дегенерирует или частично включается в состав имагинальной (Voronezhskaya et al., 2002, 2003, 2008, 2010; Nezlin, 2010). Полученные данные позволяют сделать одно существенное дополнение: нейрогенез трохофорных животных всегда начинается с появления сенсорных (вероятнее всего хемосенсорных) периферических нейронов, а базальные отростки некоторых из них формируют остов будущей дефинитивной нервной системы.

Тот факт, что сенсорные нейроны первыми дифференцируются в процессе онтогенеза, позволяет предположить, что для реализации программы развития зародышу важно воспринимать какие-то растворенные в воде химические сигналы. Единственным известным к настоящему времени химическим веществом, которое воспринимается сенсорными нейронами личинки и изменяет ход ее развития (вызывает переход в особую, "спящую" форму), является "дауэровский феромон", выделяемый личинками нематоды Caenorhabditis elegans (Bargman, Horvitz, 1991; Jeong et al., 2005). Однако подобный механизм, по-видимому, присутствует и в развитии трохофорных животных. Так, у пресноводных легочных моллюсков L. stagnalis и H. trivolvis апикальные сенсорные нейроны инкапсулированных личинок воспринимают химические сигналы, испускаемые взрослыми особями, и участвуют в регуляции темпов развития (Voronezhskaya et al., 2004, 2008). Можно предположить, что и у других видов трохофорных животных ранние сенсорные нейроны участвуют в регуляции развития, и результаты наших фармакологических экспериментов это подтверждают.

Фармакологическое воздействие на развивающихся личинок *P. maculata* и *P. dumerilii* начинали на стадии, когда еще отсутствуют ранние периферические нейроны, и заканчивали на стадии развитой трохофоры или метатрохофоры. То, что миансерин не оказывал влияния на развитие, может говорить о том, что этот блокатор серотониновых рецепторов хоть и обладает широким спектром действия, но не является специфичным для эмбриональных рецепторов этих полихет. Однако для моллюска *H. trivolvis* было показано, что именно миансерин является наиболее эффективным блокатором 5-НТ рецепторов, участвующих в регуляции биения ресничек у эмбрионов (Goldberg et al., 1994) и модуляции темпов развития со стороны нейронов ACO (Voronezhskaya et al., 2004). Подавление синтеза серотонина инкубацией в РСРА приводило к тому, что реакция в 5-HT-ИР нейронах ослабевала или исчезала, и тем не менее общая морфология личинок *Р. тас*ulata и паттерн FMRFa-ИР элементов соответствовали контрольным. Разумеется, мы не могли добиться полного прекращения синтеза серотонина всеми эмбриональными нейронами, так как более высокие концентрации РСРА были токсичными. Между тем, известно, что видимому глазом изменению яркости флуоресценции при од-

ОНТОГЕНЕЗ том 48 № 2 2017

ной и той же концентрации антител соответствует изменение содержания соответствующего моноамина более чем в два раза (Diefenbach et al., 1995; Croll et al., 1997; Ivashkin et al., 2015). Такого изменения в содержании вещества должно быть достаточно для выраженного эффекта, если он потенциально присутствует. Необходимо отметить, что ослабление синтеза в РСРА было концентрационно-зависимым: в растворе с более высокой концентрацией блокатора выявлялось меньше нейронов, и все равно, морфология личинок и паттерн FMRFa-ИР элементов не отличались от контроля. Таким образом, полученные нами результаты позволяют предположить, что ни потеря чувствительности к серотонину, ни снижение его синтеза, не приводят к нарушению развития.

После инкубации в растворах предшественника синтеза серотонина 5-НТР (то есть повышения уровня эндогенного серотонина) морфология личинок и паттерн 5-НТ-ИР нейронов сильно отличались от контрольных. У обоих видов общая морфология и паттерн 5-НТ-ИР элементов у личинок, инкубированных в 5-НТР, соответствуют в зависимости от концентрации стадии ранней трохофоры или даже протрохорфоры. Иными словами, через 50-60 ч после оплодотворения, когда контрольные личинки достигли соответствующей стадии, личинки с повышенным уровнем синтеза 5-НТ развились лишь до стадии, соответствующей 30-40 ч, то есть были почти в два раза младше. Эффект торможения развития инкубацией в предшественнике синтеза был конценрационно-зависимым и сильнее проявлялся в большей концентрации.

При инкубации в растворе 5-НТ (то есть повышении уровня экзогенного серотонина) развитие личинок также затормаживалось, но наблюдался еще и концентрационно-зависимый хаотичный спрутинг нервных волокон. Мы предполагаем, что ранние периферические 5-НТ-ИР нейроны участвуют не только в регуляции темпов личиночного развития, но и в установлении паттерна нервной системы. Ранее было предположено, что АСО личинок полихет и моллюсков - это не только сенсорный, но и эндокринный орган, выделяющий гормоны, которые влияют на эмбриональное или личиночное развитие и поведение (Lacalli, 1984; Kempf et at., 1997). Кроме того, на основании электронномикроскопических результатов было показано, что в нервной системе брюхоногих моллюсков может происходить непосредственный выброс 5-НТ в гемолимфу (Hernadi et al., 1989; Elekes, 1991). Таким образом, компактный нейропиль АСО, состоящий из отростков с множественными варикозами, может служить местом активного выделения 5-НТ, создавая, таким образом, градиент этого медиатора в теле личинки. Ранее мы предположили, что выделяемый нейропилем АСО медиатор участвует в навигации

конусов роста нейритов пионерных нейронов (Voronezhskaya et al., 2003). Результаты наших фармакологических экспериментов подтверждают эти предположения.

Вероятнее всего 5-НТ-ергические нейроны АСО создают передне-задний градиент концентрации серотонина, важный для нейродифференцировки и навигации отростков дифференцирующихся нейронов. Повышение концентрации предшественника синтеза усиливает синтез и выброс серотонина, но не влияет на градиент, поэтому происходит торможение развития, но конфигурация нервной системы и расположение нейронов сохраняются. Повышение концентрации экзогенного серотонина неизбежно уничтожает градиент и приводит к необратимым нарушениям развития. Таким образом, можно предположить, что 5-НТ-ИР нейроны АСО участвуют и в регуляции темпов развития, и в управлении нейрогенезом.

Для трохофор катушки было предположено, что рост нейритов 5-НТ-содержащей клетки блокируется при увеличении в ней синтеза серотонина (Diefenbach et al., 1995), и, наоборот, число ветвлений увеличивается при падении уровня серотонина (Baker et al., 1993). Вполне вероятно, что аналогичный механизм действия серотонина проявляется и в случае клеток другой медиаторной специфичности, вызывая блокировку или нарушение роста отростков периферических пионерных нейронов. Ранее мы показали, что увеличение синтеза 5-НТ в апикальных нейронах катушки и дофамина в апикальных нейронах прудовика происходит в ответ на химические сигналы из внешней среды (Voronezhskaya et al., 2004). Можно предположить, что торможение развития, включая нейрогенез, через усиление активности 5-НТ-ергических сенсорных нейронов является базовым механизмом регуляции личиночного развития трохофорных животных.

Инкубацию в растворе FMRFa проводили, поскольку среди ранних нейронов есть клетки иммунореактивные к антителам против этого нейропептида. Тот факт, что FMTFa не влиял на личиночное развитие, позволяет предположить, что именно продукция серотонина, а не пептида, ранними периферическими нейронами участвует в поляризации личинки, необходимой для навигации отростков пионерных нейронов.

Известно, что формирование периферической иннервации конечностей членистоногих всегда начинается с сенсорных пионерных нейронов (Bate 1976; Bentley, Keshishian, 1982; Ho, Goodman, 1982; Klose, Bentley, 1989; Boyan, Williams, 2007). Наши данные показывают, что у репрезентативных представителей трохофорных животных, имеющих бифазный жизненный цикл, формирование центральной нервной системы всегда начинается с периферических сенсорных нейронов, некоторые из которых являются пионерными. При этом увеличение активности периферических сенсорных нейронов оказывает влияние на темпы развития и нейрогенез. Какие именно сигналы воспринимают ранние сенсорные нейроны, остается неизвестным.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (проект № 14-04-00673 для ЛПН и № 15-29-02650 для ЕЕВ). Авторы выражают благодарность Е.Б. Цитрину за помощь при проведении экспериментов с личинками филлодоце. Анализ препаратов был проведен с использованием оборудования ЦКП ИБР РАН (Москва) и ЦКП ИБМ ДВО РАН (Владивосток).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- *Baker M.W., Vohra M.M., Croll R.P.* Serotonin depletors, 5,7-dihydroxytryptamine and *p*-chlorophenylalanine, cause sprouting in the CNS of the adult snail // Brain Research. 1993. V. 623. P. 311–315.
- Bargmann C.I., Horvitz H.R. Control of larval development by chemosensory neurons in *Caenorhabditis elegans* // Science. 1991. V. 251. P. 1243–1246.
- *Bate C.M.* Pioneer neurons in an insects embryo // Nature. 1976. V. 260. P. 54–56.
- *Battonyai I., Voronezshkaya E.E., Obukhova A. et al.* Early elements of the larval nervous system of *Dreissena //* ISIN. 13th Symposium on Invertebrate Neurobiology. August 26–30. 2015. Tihany. Hungary. P. 16.
- Bentley D., Keshishian H. Pathfinding by peripheral pioneer neurons in grasshoppers // Science. 1982. V. 218. P. 1082–1088.
- *Bonar D.B.* Ultrastructure of a cephalic sensory organ in larva of the gastropod *Phestilla sibogae* (Aeolidacea, Nudibranchia) // Tissue Cell. 1978. V. 10. P. 153–165.
- *Boyan G.S., Williams J.L.D.* Embryonic development of a peripheral nervous system: Nerve tract associated cells and pioneer neurons in the antenna of the grasshopper *Schistocerca gregaria* //Arthropod Structure, Development. 2007. V. 36. P. 336–350.
- Brinkmann N., Wanninger A. Larval neurogenesis in Sabellaria alveolata reveals plasticity in polychaete neural patterning // Evolution and Development. V. 10. P. 606–618.
- Buznikov G.A., Nikitina L.A., Voronezhskaya E.E. et al. Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia) // Cell Tissue Res. 2003. V. 311. P. 259–266.
- Chia F.S., Koss R. Fine structure of the cephalic sensory organ in the larva of the nudibranch Rostanga pulchra (Mollusca, Opisthobranchia, Nudibranchia) // Zoomorphology. 1984. V. 104. P. 131–139.
- *Croll R.P.* Gastropod chemoreception // Biol. Rev. 1983. V. 58. P. 293–319.
- Croll R.P. Insights into early molluscan neuronal development through studies of transmitter phenotypes in em-

bryonic pond snails // Microsc. Res. Tech. 2000. V. 49. P. 570–578.

- Croll R.P., Baker M.W., Khabarova M.Y. et al. Serotonin depletion after prolonged chlorpromazine treatment in a simpler model system // Gen. Pharmacol. 1997. V. 29. P. 91–96.
- Croll R.P., Voronezhskaya E.E. Early elements in gastropod neurogenesis // Devel. Biol. 1996. V. 173. P. 344–347.
- Croll R.P., Voronezhskaya E.E. Early FMRFamide-like immunoreactive cells in gastropod neurogenesis // Acta Biol. Hung. 1995. V. 46. P. 295–303.
- Dickinson A.J.G., Croll R.P., Voronezhskaya E.E. Development of embryonic cells containing serotonin, catecholamines and FMRFamide-related peptides in *Aplysia californica* // Biol. Bull. 2000. V. 199. P. 305–315.
- Dickinson A.J.G., Nason J., Croll R.P. Histochemical localization of FMRFamide, serotonin and catecholamines in embryonic Crepidula fornicata (Gastropoda, Prosobranchia) // Zoomorphology. 1999. V. 119. P. 49–62.
- Diefenbach T.J., Sloley B.D., Goldberg J.I. Neurite branch development of an identified serotonergic neuron from embryonic *Helisoma*: evidence for autoregulation by serotonin // Dev. Biol. 1995. V. 167. P. 282–293.
- *Elekes K.* Serotonin-immunoreactive varicosities in the cell body layer and neural sheath of the snail, *Helix pomatia*, ganglia: An electron microscopic immunocytochemical study // Neuroscience. 1991. V. 42. P. 583–591.
- Glebov K., Voronezhskaya E.E. Khabarova M.Yu. et al. Mechanisms underlying dual effects of serotonin during development of *Helisoma trivolvis* (Mollusca) // BMC Developmental Biology. 2014. V. 14. I. 14. P. 1–19.
- Goldberg J.I., Koehncke N.K., Christopher K.J. et al. Pharmacological characterization of a serotonin receptor involved in an early embryonic behavior of *Helisoma trivolvis* // J. Neurobiol. 1994. V. 25. P. 1545–1557.
- Hadfield M.G., Meleshkevitch E.A., Boudko D.Y. The apical sensory organ of a gastropod veliger is a receptor for settlement cues // Biol. Bull. 2000. V. 198. P. 67–76.
- Haszprunar G., Friedrich S., Wanninger A. et al. Fine structure and immunochemistry of a new chemosensory system in the chiton larva (Mollusca: Polyplacophora) // J. Morphol. 2002. V. 251. P. 210–218.
- Hernadi L., Elekes K., Salanki-Rosa K. Distribution of serotonin-containing neurons in the central nervous system of the snail *Helix pomatia*. Comparison of immunocytochemical and 5,6-dihydroxytryptamine labeling // Cell Tissue Res. 1989. V. 257. P. 313–323.
- *Ho R.K., Goodman C.S.* Peripheral pathways are pioneered by an array of central and peripheral neurones in grasshopper embryos // Nature. 1982. V. 297. P. 404–406.
- *Ivashkin E., Khabarova M.Yu., Melnikova V. et al.* Serotonin mediates maternal effects and directs developmental and behavioral changes in the progeny of snails // Cell Rep. 2015. V. 18. P. 1144–1158.
- Jeong P.Y., Jung M., Yim Y.H. et al. Chemical structure and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone // Nature. 2005. V. 433. P. 541–545.
- Kempf S.C., Page L.R., Pires A. Development of serotoninlike immunoreactivity in the embryos and larvae of nudibranch mollusks with emphasis on the structure and possible function of the apical sensory organ // J. Comp. Neurol. 1997. V. 386. P. 507–528.

- *Klose M., Bentley D.* Transient pioneer neurons are essential for formation of an embryonic peripheral nerve // Science. 1989 V. 245. P. 982–984.
- *Lacalli T.C.* Structure and organization of the nervous system in the trochophore larva of *Spirobranchus //* Phil. Trans. R. Soc. London B. 1984. V. 306. P. 79–135.
- Marlow H., Tosches M.A., Tomer R. et al. Larval body patterning and apical organs are conserved in animal evolution // BMC Biology. 2014. V. 12. I. 7. P. 1–17.
- Marois R., Carew T.J. Ontogeny of serotonergic neurons in Aplysia californica // J. Comp. Neurol. 1997. V. 386. P. 477–490.
- Meyer N.P., Carrillo-Baltodano A., Moore R.E. et al. Nervous system development in lecithotrophic larval and juvenile stages of the annelid Capitella teleta // Front. Zool. 2015. V. 12. P. 1–17. doi 10.1186/s12983-015-0108-y
- Nezlin L.P. The Golden age of comparative morphology: laser scanning microscopy and neurogenesis in trochophore animals // Rus. J. Dev. Biol. 2010. V. 41. № 6. P. 381–390.
- Nezlin L.P., Starunov V.V. Development of the apical sensory organ in *Platynereis dumerilii* (Nereididae, Annelida) // Zoomorphology. 2017. В печати.
- Shepherd G.M. Neurobiology. Oxford University Press, 1988. 689 p.
- Starunov V.V., Voronezhskaya E.E., Nezlin L.P. Development of the nervous system in *Platynereis dumerilii* (Nereididae, Annelida) // Frontiers in Zoology. 2017. В печати.
- Voronezhskaya E.E., Elekes K. Transient and sustained expression of FMRFamide-like immunoreactivity in the developing nervous system of Lymnaea stagnalis (Mollusca, Pulmonata) // Cell. Mol. Neurobiol. 1996. V. 16. P. 661–676.
- Voronezhskaya E.E., Ivashkin E.G. Pioneer neurons: a basis or limiting factor of Lophotrochozoa nervous system diversity? // Russ. J. Dev. Biol. 2010. V. 41. P. 337–346.
- Voronezhskaya E.E., Khabarova M.Yu., Nezlin L.P. Apical sensory neurons mediate developmental retardation induced by conspecific environmental stimuli in freshwater pulmonate snails // Development. 2004. V. 131. P. 3671–3680.
- Voronezhskaya E.E., Nezlin L.P., Odintsova N.A. et al. Neuronal development in larval mussel Mytilus trossulus (Mollusca: Bivalvia) // Zoomorphology. 2008. V. 127. P. 97–110.
- Voronezhskaya E.E., Tsitrin E.B., Nezlin L.P. Neuronal development n larval polychaete *Phyllodoce maculata* (Phyllodocidae) // J. Comp. Neurol. 2003. V. 455. P. 299–309.
- 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.
- Wanninger A., Haszprunar G. The development of the serotonergic and FMRF-amidergic nervous system in Antalis entails (Mollusca, Scaphopoda) // Zoomorphology. 2003. V. 122. P. 77–85.
- Yaguchi S., Katow H. Expression of tryptophan 5-hydroxylase gene during sea urchin neurogenesis and role of serotonergic nervous system in larval behavior // J. Comp. Neurol. 2003. V. 466. P. 219–229.

Early Peripheral Sensory Neurons in the Development of Trochozoan Animals

L. P. Nezlin* and E. E. Voronezhskaya

Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334, Russia

*e-mail: nezlinl@mail.ru

Received May 13, 2016; in final form, October 26, 2016

Neuronal development of the majority of trochozoan animals with biphasic pelago-bentic life cycle starts from transient peripheral neurons, which do not belong to the central nervous system and are mainly located in the apical sensory organ and in the hyposphere. Some of these neurons are pioneer and send neurites that form a scaffold upon which the adult central nervous system later develops. In representative species of mollusks and polychaetes, immunolabeling with the antibodies against neurotransmitters serotonin and FMR-Famide and acetylated α -tubulin revealed that the structure of almost all early peripheral neurons is typical for sensory, most probably chemosensory cells: flask shape, and cilia at the end of the apical dendrite or inside the distal ampoule. Morphology, transmitter specificity, location, and projections of the early sensory cells differ in trochophores of different species, thus suggesting different origin of these cells. In polychaete larvae, pharmacological inhibition of serotonin synthesis in early peripheral neurons did not affect the development, whereas its increase resulted in developmental arrest and neural malformations, suggesting that early peripheral sensory neurons are involved in developmental regulation.

Keywords: Trochozoa, trochophore, sensory neurons, pioneer neurons, apical sensory organ, 5-HT, FMRFamide, tubulin, regulation of development