

ПОЛОВЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ В ООЦИТАХ ПРЭСНОВОДНЫХ ГУБОК

© 2017 г. Е. Л. Гोनоблева*, С. М. Ефремова

Санкт-Петербургский государственный университет
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9

*E-mail: gonobol@mail.ru

Поступила в редакцию 10.10.2016 г.

Оогенез и ультраструктурное строение половых детерминант пресноводных губок *Eunapius fragilis* и *Swartschewskia papyracea* исследованы с помощью световой и электронной микроскопии. Впервые у губок в цитоплазме ооцитов выявлены герминативные гранулы, окруженные митохондриями – ультраструктурный признак “зародышевой плазмы” у ряда многоклеточных животных. Показано структурное изменение половых детерминант в ходе оогенеза и выявлены признаки участия митохондрий в формировании центрального компонента половых детерминант.

Ключевые слова: губки, оогенез, половые детерминанты, митохондриальные облака, зародышевая плазма

DOI: 10.7868/S0475145017030053

ВВЕДЕНИЕ

Половые детерминанты – одно из названий особых органелл, присутствующих в половых клетках многоклеточных животных (Kloc et al., 2004). Половые детерминанты являются надежным морфологическим маркером клеток половой линии. Эти структуры часто входят в состав так называемой “зародышевой плазмы” – участка цитоплазмы ооцита, ответственного за спецификацию линии половых клеток эмбриона при т.н. преформационном способе сегрегации линии половых клеток (обзор Ectavoug, Akam, 2003).

Присутствие детерминант, или герминативных гранул, свидетельствует о принадлежности клеток, их содержащих, к линии половых или плюрипотентных стволовых клеток. Закономерности в расположении этих органелл в цитоплазме ооцита указывают на наличие зон, участвующих в формировании будущих первичных половых клеток (ППК), и косвенно указывают на детерминированный характер развития. Структура герминативных гранул и стадия оогенеза, на которой они выявлены, могут свидетельствовать о способе детерминации линии половых клеток и о наличии или отсутствии “зародышевого пути” у исследуемого вида.

Вопрос о происхождении половых клеток и о наличии “зародышевого пути” у губок до сих пор остается открытым (Ефремова, 1988; Ectavoug, Akam, 2003; Funayama 2010). В настоящее время для решения этого вопроса используется несколько методических подходов: выявление молекулярных маркеров половых клеток; выяснение характера экспрессии маркерных генов с по-

мощью гибридизации *in situ*; выяснение характера локализации белкового продукта этих генов с помощью иммуноцитохимических методов; выявление и описание морфологических маркеров линии половых клеток. К настоящему времени комплексное исследование о происхождении половых клеток у губок отсутствует. Связано это, главным образом, с методическими трудностями, обусловленными особенностями организации губок, отсутствием у них оформленных органов и тканей, чрезвычайной трудностью в идентификации типов клеток (особенно на переходных стадиях их дифференцировки) и феноменом живорождения, свойственным большинству губок. Это определяет фрагментарность сведений о происхождении линии половых клеток у этой группы многоклеточных и, вместе с тем, повышает значение любых фактов, проливающих свет на этот актуальный вопрос биологии развития.

К настоящему времени герминативные гранулы найдены у двух видов морских губок: *Oscarella malakhovi* (Homoscleromorpha) (Исаева, Ахмадиева, 2011) и *Paraleucilla magna* (Calcarea) (Lanna, Klautau, 2010). Они представлены одиночными окоядерными скоплениями фиброгранулярного электроноплотного материала.

В ооцитах пресноводных губок *Eunapius fragilis* и *Swartschewskia papyracea* нами выявлены половые детерминанты в виде митохондриальных облаков. Показано ультраструктурное изменение половых детерминант в ходе оогенеза, косвенно свидетельствующее об участии митохондрий в формировании центрального компонента детерминант.

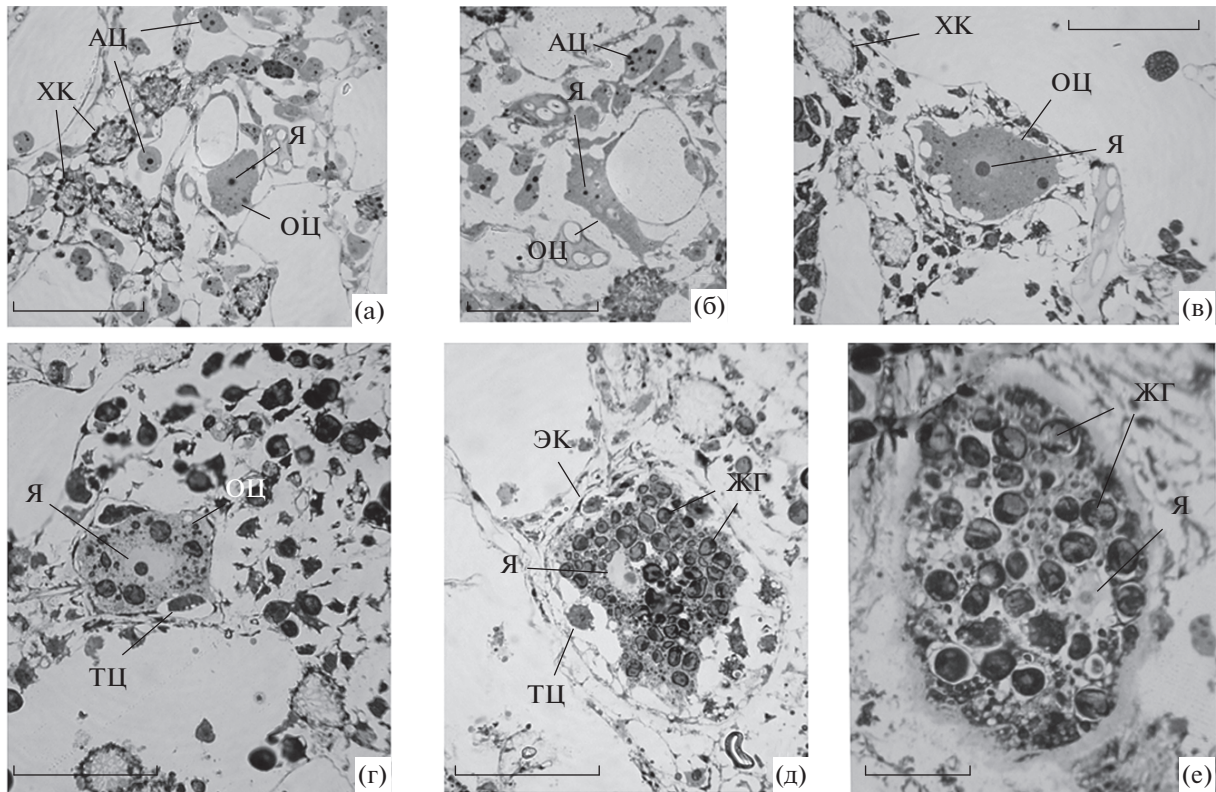


Рис. 1. Оогенез губки *Eunapius fragilis*. Полутолки срезы. (а, б) Ооциты на этапе цитоплазматического роста в мезохиле материнской губки. (в) Ооцит на завершающем этапе цитоплазматического роста, формирование эмбриональной капсулы. (г, д) Вителлогенный этап оогенеза. Миграция трофоцитов к ооцитам и формирование желтка. (е) Завершение вителлогенного этапа оогенеза, сформированный ооцит. Шкала: (а, б, в) – 60 мкм; (г, д, е) – 50 мкм. Условные обозначения: АЦ – археоцит, ЖГ – желточные гранулы, ОЦ – ооцит, ТЦ – трофоцит, ЭК – эмбриональная капсула, Я – ядро.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования оогенеза пресноводных губок был собран в Каменном ручье, вытекающем из Английского пруда в Петродворце, в окрестностях Санкт-Петербурга (*Eunapius fragilis* (Leidy, 1851)) и в озере Байкал (*Swartschewskia papyracea* (Dybowski, 1880)). Губок *Swartschewskia papyracea* (Demospongiae, Naplosclerida, Spongillidae) собирали конце июня и первой половине июля, губок *Swartschewskia papyracea* (Demospongiae, Naplosclerida, Lubomirskiidae) собирали с помощью аквалангической техники с глубины 5–10 метров в середине июля. Для световой микроскопии кусочки губки фиксировали в жидкости Буэна. Для электронно-микроскопического анализа небольшие кусочки губок фиксировали в смеси 1% глутарового альдегида и 1% четырехоксида осмия на фосфатном буфере в течение 1 ч (в двух сменах фиксатора). Фиксацию осуществляли сразу после сбора материала при температуре окружающего воздуха. После дегидратации материала в этаноле и ацетоне производили заливку в эпоксидную смолу. Полутолки и ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB Nova. Полутолки срезы окрашивали 1% толлуидиновым синим.

Ультратонкие срезы контрастировали спиртовым раствором ацетата уранила и цитратом свинца и изучали с помощью трансмиссионного микроскопа BS-500 TESLA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оогенез

Пресноводные губки чаще всего раздельнополы. В период полового созревания в мезохиле женских особей наблюдается появление ранних ооцитов. На этапе цитоплазматического роста ооциты представляют собой амебоидные клетки с цитоплазмой, содержащей незначительное количество базофильных включений, крупное ядро содержит ядрышко (рис. 1а, 1б). На этих стадиях ооциты часто обнаруживаются вблизи каналов водоносной системы, образованных эндопинакцитами (рис. 1а, 1б). Диаметр ооцитов с такими морфологическими характеристиками составляет около 20–35 мкм. Затем наступает вителлогенный этап оогенеза. Ооциты, находясь в толще мезохила, останавливаются и окружаются слоем уплощенных клеток эмбриональной капсулы (рис. 1в). Через слой клеток эмбриональной кап-

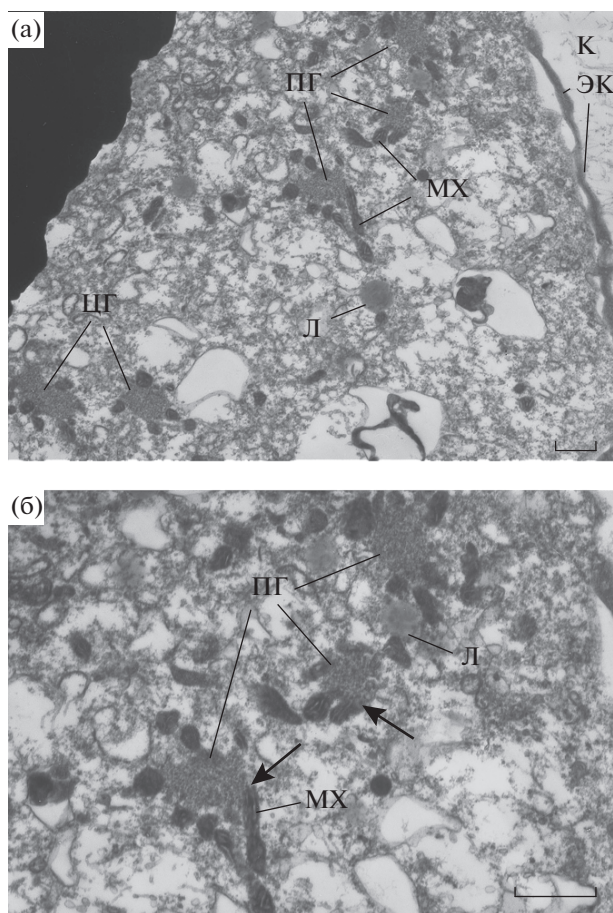


Рис. 2. Герминативные гранулы в цитоплазме ооцитов на завершающих этапах цитоплазматического роста. Электронограммы. (а) Участок цитоплазмы ооцита с многочисленными герминативными гранулами. (б) Ультраструктура половых детерминант. Шкала: 2 мкм. Условные обозначения: Л – липидные включения; ПГ – герминативные гранулы; МХ – митохондрии; К – коллаген; ЭК – эмбриональная капсула.

сулы к ооциту начинают мигрировать специализированные клетки – трофоциты (рис. 1г). Они фагоцитируются ооцитами и постепенно трансформируются в многочисленные желточные гранулы, заполняющие цитоплазму растущих ооцитов. В вителлогенный период средний диаметр ооцита увеличивается от 40 до 200 мкм (рис. 1г–1е). Этапы развития ооцитов сходны у обоих исследованных видов губок.

Ультраструктура половых детерминант (герминативных гранул)

На электронограммах ооцитов *E. fragilis*, находящиеся на завершающих этапах цитоплазматического роста (рис. 1в) обнаруживаются многочисленные герминативные гранулы (рис. 2а). Они состоят из электроплотного фиброгранулярного материала, образующего на срезах округлые или

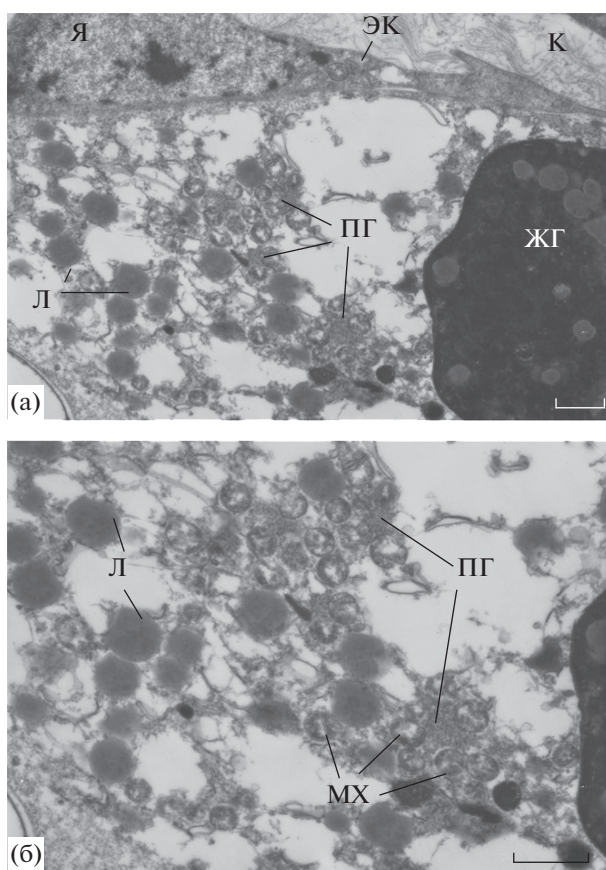


Рис. 3. Герминативные гранулы в цитоплазме ооцитов на ранней вителлогенной стадии. Электронограммы. (а) Участок цитоплазмы ооцита с многочисленными герминативными гранулами. (б) Ультраструктура герминативных гранул. Шкала: 2 мкм. Условные обозначения: ЖГ – желточная гранула; Л – липидные включения; ПГ – герминативные гранулы; МХ – митохондрии; К – коллаген; ЭК – эмбриональная капсула.

эллипсоидные, с неровной поверхностью, структуры. Этот центральный компонент половых детерминант окружен многочисленными митохондриями. Срезы митохондрий имеют разную форму: от округлой до вытянутой или гантелевидной (рис. 2а, 2б). Митохондрии имеют пластинчатые кристы и электроплотный матрикс. На отдельных электронограммах видна картина непосредственного слияния митохондрий и центрального компонента половых детерминант (рис. 2б, стрелки).

В цитоплазме ооцитов, находящихся на ранней вителлогенной стадии (рис. 1г), также обнаруживаются многочисленные половые детерминанты (рис. 3а, 4). Центральный компонент гранул представляет собой электроплотный фиброгранулярный материал. Он образует округлые на срезах скопления с неровной поверхностью, диаметр которых колеблется в пределах 1.5–2.5 мкм. Центральный компонент герминативных гранул окру-

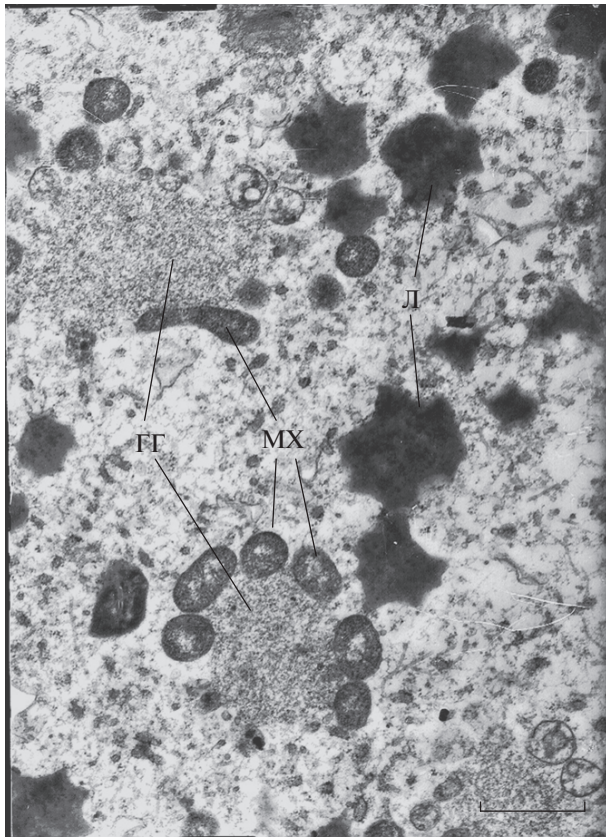


Рис. 4. Герминативные гранулы в цитоплазме ооцита губки *Swartschewskia papyracea*. Электронограмма. Условные обозначения: Л – липидные включения; ГГ – герминативные гранулы; МХ – митохондрии. Шкала 2 мкм.

жен многочисленными митохондриями (рис. 3а, 4). На срезах они имеют исключительно округлую форму. Матрикс электронопрозрачный с незначительными включениями электроплотного материала (рис. 3б). Пластинчатые кристы более редкие, чем на предыдущей стадии.

Специальных исследований о локализации половых детерминант в ооцитах мы не проводили. На основании имеющихся данных можно сказать, что они встречаются и в центральной и в периферической цитоплазме ооцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Среди многочисленных отрядов типа Porifera оогенез представителей отряда Naplosclerida описан наиболее подробно. Этапы оогенеза *E. fragilis* сходны с таковыми у описанных ранее видов этого отряда (см. обзор Ересковский, 1999).

Половые детерминанты (герминативные гранулы) к настоящему времени описаны у двух видов губок: *Oscarella malakhovi* (Homoscleromorpha) (Исаева, Ахмадиева, 2011) и у *Paraleucilla magna*

(Calcarea) (Lanna, Klautau, 2010). У *O. malakhovi* герминативные гранулы выявлены в стволовых плюрипотентных клетках – археоцитах (Исаева, Ахмадиева, 2011). Герминативные гранулы *O. malakhovi* представляют собой мелкозернистые электроплотные тельца, не имеющие четко очерченной границы. Подобные структуры присутствуют в стволовых плюрипотентных клетках ряда беспозвоночных: кишечнополостных (Noda, Kanai, 1977; Исаева и др., 2011), планарий (Hori, 1982; Isaeva et al., 2005), корнеголовых раков (Shukalyuk et al., 2005). При дифференцировке стволовых клеток в различные типы специализированных клеток эти образования исчезают, а при трансформации их в половые клетки – сохраняются (Shibata et al., 1999; Исаева, Ахмадиева, 2011). Эти наблюдения позволили предположить, что герминативные гранулы поддерживают тотипотентное состояние стволовых и половых клеток. Вместе с тем, присутствие герминативных гранул в стволовых плюрипотентных клетках не является свидетельством их будущей трансформации в клетки половой линии.

У известковой губки *P. magna* структуры, напоминающие герминативные гранулы *O. malakhovi*, выявлены в ооцитах, находящихся на стадии цитоплазматического роста (Lanna, Klautau, 2010).

Обнаруженные нами в ооцитах пресноводных губок структуры являются классическими половыми детерминантами, компонентами половой (зародышевой) плазмы животных с преформационным типом спецификации линии половых клеток. Митохондриальные облака, схожие по структуре с половыми детерминантами изученных пресноводных губок, присутствуют в зародышевой плазме ксенопуса и дрозофилы. Присутствие ассоциированных с митохондриями герминативных гранул выявлено у губок впервые. Описанные нами картины слияния митохондрий и центрального компонента гранул свидетельствуют в пользу того, что содержимое митохондрий принимает участие в формировании центрального компонента герминативных гранул (Isaeva, Reunov, 2001). Это подтверждается и выявленным нами изменением ультраструктуры митохондрий в ходе оогенеза. Структурное изменение половой плазмы в процессе оогенеза и развития показано у таких модельных объектов, как *Drosophila*, *Xenopus* и *Caenorhabditis* (Kloc et al., 2004, 2014).

Присутствие половых детерминант в ооцитах пресноводных губок и сходство ее структуры с половыми детерминантами у животных с преформационным способом обособления линии половых клеток свидетельствует о возможности существования “зародышевой плазмы” у губок. Возможно, у губок таким образом происходит преформация не линии первичных половых клеток, а линии мультипотентных стволовых клеток, что согласу-

ется с гипотезой, высказанной в 2013 г. Хорди Солана (Solana, 2013). Для прояснения этого вопроса требуются дальнейшие исследования.

Авторы выражают благодарность Р.П. Костюченко и М.Д. Воронцову. Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных центров СПбГУ “Хромас” и “Культивирование микроорганизмов”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ересковский А.В.* Развитие губок отряда Naplosclerida // Биол. моря. 1999. Т. 25. № 5. С. 333–343.
- Ефремова С.М.* Происхождение половых клеток и проблема “зародышевого пути” у губок // Губки и книдарии. Л.: ЗИН АН СССР, 1988. С. 17–22.
- Исаева В.В., Реунов А.А.* Половая плазма и детерминация линии половых клеток: роль митохондрий // Биол. моря. 2001. Т. 27. № 4. С. 231–237.
- Исаева В.В., Ахмадиева А.В.* Герминальные гранулы в археоцитах губки *Oscarella malakhovi* Ereskovsky, 2006 // Биол. моря. 2011. Т. 37. № 4. С. 199–207.
- Исаева В.В., Ахмадиева А.В., Александрова Я.Н., Шукалюк А.И., Чернышев А.В.* Герминальные гранулы интестициальных клеток колониальных гидроидов *Obelia longissimi* Pallas, 1766 и *Ectopleura crocea* Agassiz, 1862 // Биол. моря. 2011. Т. 37. № 4. С. 292–299.
- Extavour C., Akam M.* Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation // Development. 2003. V. 130. P. 5869–5884.
- Funayama N.* The stem cell system in demosponges: insights into the origin of somatic stem cells // Dev. Growth. Differ. 2010. V. 52(1). P. 1–14.
- Kloc M., Jedrzejowska I., Tworzydło W., Bilinsky S.* Balbiani body, nuage and sponge bodies – the germ plasm pathway players // Arthropod Struct. Dev. 2014. V. 43. P. 341–348.
- Kloc M., Bilinski S., Etkin L.* The Balbiani body and germ cell determinants: 150 years later // Curr. Top. Dev. Biol. 2004. V. 59. P. 1–36.
- Lanna E., Klautau M.* Oogenesis and spermatogenesis in *Paraleucilla magna* (Porifera, Calcarea) // Zoomorphology. 2010. V. 129. I. 4. P. 249–261.
- Noda K., Kanai C.* Observation of *Pelmatohydra robusta* at sexual and asexual stages, with a special reference to “germinal plasm” // J. Ultrastruct. Res. V. 61. P. 284–294.
- Shibata N., Umesono Y., Orii H., Sakurai T., Watanabe K., Agata K.* Expression of vasa(vas)-related genes in germline cells and totipotent somatic stem cells of planarians // Dev. Biol. 1999. V. 206(1). P. 73–87.
- Shujalyuk A., Isaeva V., Kizilova E., Baiborodin S.* Stem cells in reproductive strategy of colonial rhizocephalan crustaceans (Crustacea: Cirripedia: Rhizocephala) // Invertebr. Reprod. Dev. 2005. V. 48. P. 41–53.
- Solana J.* Closing the circle of germline and stem cells: the primordial stem cell hypothesis // EvoDevo. 2013. V. 4. P. 2.

Germ-Cell Determinants in the Oocytes of Freshwater Sponges

E. L. Gonobobleva* and S. M. Efremova

St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

**e-mail: gonobol@mail.ru*

Received Oktober 10, 2016

The paper reports a light and electron microscopy study of the ultrastructure and oogenesis of germ-cell determinants in freshwater sponges *Eunapius fragilis* and *Swartschewskia papyracea*. For the first time, germinal granules surrounded by mitochondria, the ultrastructural signature of germinal plasma in a number of metazoan organisms, has been described in Porifera. Structural changes in germ determinants in the course of oogenesis have been described, and participation of mitochondria in the formation of the central component of germ-cell determinants has been suggested.

Keywords: Porifera, oogenesis, germ-cell determinants, mitochondrial clouds, germinal plasma