

УДК 591.4

АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРЕДШЕСТВУЮТ ЗАРАЖЕНИЮ СИМБИОТИЧЕСКИМИ БАКТЕРИЯМИ ЛИЧИНОК ПОГОНОФОР (Siboglinidae, Annelida)

© 2022 г. Н. Н. Римская-Корсакова^{1,*}, Е. Н. Темерева¹, академик РАН В. В. Малахов¹

Поступило 27.04.2022 г.
После доработки 22.05.2022 г.
Принято к публикации 25.05.2022 г.

Впервые исследовано тонкое строение стенки тела и кишки у компетентных личинок френулятной погонофоры *Siboglinum fiordicum*. Впервые зарегистрировано явление массового апоптоза ядер клеток кожно-мышечного мешка и целотелия. Апоптотические ядра обнаружены как в цитоплазме клеток, так и вне тела личинки. В последнем случае каждое ядро окружено плазмалеммой, а все скопление покрыто кутикулой. Клетки личиночной кишки сохраняют обычное строение: их цитоплазма заполнена многочисленными желточными гранулами, а ядра имеют обычное строение. Сходные процессы ранее были описаны у вестиментифер и инициировались проникновением симбиотических бактерий через покровы в кишечник. Вероятно, у *S. fiordicum* процесс апоптотической перестройки клеток стенки тела и становления уникального симбиоза с бактериальными симбионтами разнесены во времени и происходят не одновременно, как у вестиментифер, а последовательно.

Ключевые слова: френулятные погонофоры, трофосома, симбиотические бактерии, заражение, Siboglinidae, Frenulata

DOI: 10.31857/S2686738922050249

Погонофоры, или френулятные погонофоры (Annelida: Siboglinidae) – это тубикольные черви, населяющие восстановительные биотопы такие, например, как, метановые сипы, периферия гидротермальных источников, богатые органикой осадки и др. В середине XX века френулятные погонофоры рассматривались как отдельный тип животного царства, близкий ко вторичноротым животным [1]. В настоящее время в результате морфологических и молекулярно-филогенетических исследований было надежно установлено положение погонофор внутри типа Annelida среди остальных бескишечных зибоглинид, включающих такие широко известные группы, как вестиментиферы Vestimentifera и черви-костоеды *Osedax* [2–4]. При этом френулятные погонофоры (Frenulata) являются сестринской кладой ко всем остальным зибоглинидам, что делает их

ключевой группой в изучении строения и развития Siboglinidae.

Наиболее своеобразными чертами организации Siboglinidae являются отсутствие во взрослом состоянии рта и кишечника и питание за счет симбиотических бактерий, населяющих клетки трофосомы [5]. Бактерии не передаются от материнского организма к развивающимся ооцитам, как при вертикальной передаче, но зибоглиниды приобретают бактерий горизонтально, из окружающей среды каждый раз на стадии осевшей личинки [6]. У вестиментифер, произошедших позднее погонофор в эволюции, описано, что заражение бактериями происходит через покровы туловищного отдела тела личинок. Бактерии способствуют пролиферации мезодермальных клеток, которые формируют трофосому, орган симбиотического питания, при этом ранее функционирующая кишка деградирует, а покровы и остальные ткани, через которые проникали бактерии, погибают путем апоптоза клеток [7]. Для френулятных погонофор до сих пор считается,

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
*e-mail: nadezdakorsakova@gmail.com

что бактерии попадают в тело личинок через рот, заселяют эпителий кишки, которая трансформируется в трофосому [8].

Благодаря уникальному симбиозу с бактериями черви всей группы Siboglinidae смогли колонизировать экстремальные условия, такие как жерла гидротермальных источников (вестиментиферы) и захоронения костей китов (*Osedax*), углеводородные высачивания (вестиментиферы и погонофоры). Процесс становления симбиоза до сих пор остается загадочным и требует новых данных для понимания эволюции группы и возникновения этого уникального явления.

Целью настоящей работы было исследование строения кожно-мышечного мешка, целотелия и кишки оседающей личинки френулятной погонофоры *Siboglinum fiordicum* Webb, 1963 на ультраструктурном уровне для оценки состояния тканей личинки перед заражением бактериальными симбионтами.

Для изучения ультраструктуры компетентных личинок *S. fiordicum* мы поставили эксперименты по оседанию личинок в лабораторных условиях. Морской осадок и материнские особи *S. fiordicum* были собраны дночерпателем с глубины 35 м вблизи Морской биологической станции Эсперенд, Университета Бергена, Норвегия в сентябре 2018 г. Извлеченные из материнских трубок личинки разных возрастов, от трохофор до компетентных личинок, имеющие в длину от 200 до 500 микрон, перенесены в чашки с осадком, собранным вместе с материнскими особями, для содержания при температуре 6°C [9, 10]. Через несколько недель в культуральных чашках обнаружены компетентные личинки, имеющие длину тела 800 мкм. Три компетентные личинки были зафиксированы в 3% растворе глутаральдегида на морской воде, постфиксированы в 1% тетрадоксиде осмия на морской воде и заключены в смолу Спурр. Тонкие срезы были изготовлены с использованием алмазного ножа DIATOM на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия). Тонкие срезы были перенесены на медные бленды и проконтрастированы уранил ацетатом и цитратом свинца. Материал был изучен с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEOL JEM 1011 (JEOL Ltd., Япония).

Длина тела предметаморфозных личинок составляет около 800 мкм (рис. 1а). Тело состоит из простомиума, перистомиума, передней части (2-й сегмент, несущий кутикулярный киль уздечки и зачаток щупальца), туловища (3-й сегмент с двумя рядами щетинок пояса), более шести опистосомных сегментов и пигидия (рис. 1а). Имеются ресничные шнуры прототроха, невротроха (вентральная ресничная полоска) и мезотроха.

Имеются щетинки первого опистосомального сегмента и щетинки аннулы (рис. 1а). Тело личинки покрыто кутикулой.

В ходе исследования тонкого строения покровного эпидермиса обнаружено, что форма клеток сильно изменена: клетки выглядят вздутыми и набитыми рыхлой (хлопьевидной или волокнистой) тканью, полярность эпителия была нарушена: слой базальной пластинки обнаруживается лишь на некоторых участках эпителия, клеточные контакты отсутствуют (рис. 1б–г). Мембраны клеток формируют многочисленные фестончатые складки (рис. 1б, г). По периферии клеток располагаются участки или целые апоптозирующие ядра, которые имеют характерное для апоптоза тонкое строение: у них часто нарушена ядерная мембрана, а хроматин собран в электронно-плотные периферические тяжи (рис. 1г). Над поверхностью тела личинки обнаруживаются очень необычные тела, представляющие собой скопления ядер, выброшенных из стенки тела личинки (рис. 1б). Снаружи каждое тело окружено кутикулой, внутри тела сгруппировано от одного до семи фрагментированных ядер, каждое из которых окружено сморщенной плазматической мембраной (рис. 1б).

Продольная и кольцевая мускулатура тела, характерная для личинок младшего возраста, на этой стадии отсутствует, также отсутствует специальная мускулатура щетинок и первой септы тела. Предполагаемые мышечные клетки деградируют, они лишены ядер и миофиламентов, их цитоплазма заполнена рыхлым волокнистым содержимым. Клетки целотелия также находятся на стадии деградации. Многоклеточные тубипарные железы сохраняются на этой стадии, и их протоки, выстланные микровиллярным эпителием, прослеживаются между дегенерирующих клеток стенки тела. Просвет тубипарных желез заполнен электронно-светлым секретом будущей трубки. В покровах простомиума обнаруживаются нормально развитые интраэпидермальные стволы нервной системы (рис. 1в). Личинка имеет кишку, крошечную ротовую воронку и терминальную анальную ямку. Кишка не имеет полости, наоборот, ее клетки набиты желтком так, что во внутреннем просвете кишки, поверхности клеток тесно сближены и ее просвет не прослеживается.

Недавними исследованиями вестиментифер с помощью методов просвечивающей трансмиссионной электронной микроскопии и молекулярно-генетического метода Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) показано, что заражение бактериями происходит через покровы туловищного отдела личинок [7]. Бактерии через покровы проникают в спинной мезентерий между спинным кровеносным сосудом и кишкой и вызывают про-

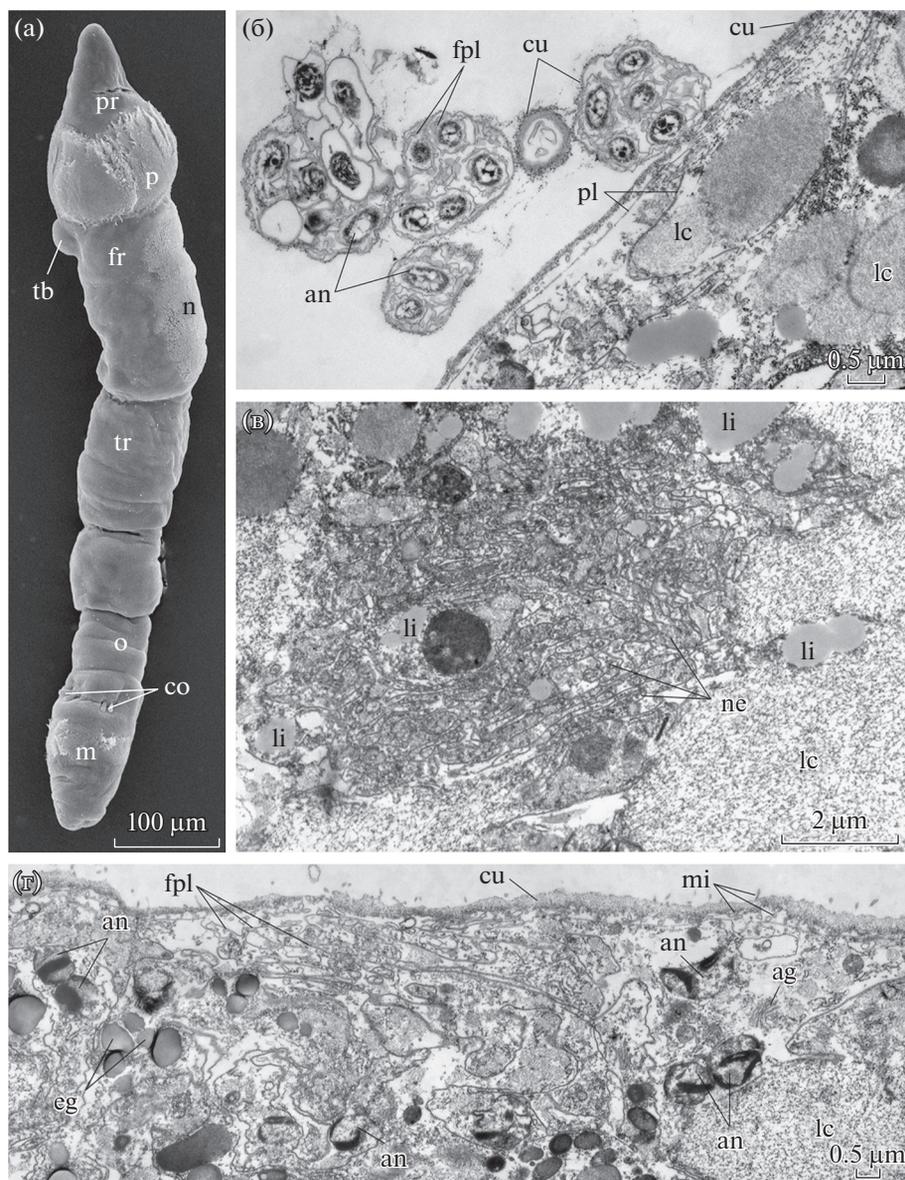


Рис. 1. Внешний вид (а) и тонкое строение покровов (б–г) предметаморфозных личинок *Siboglinum fiordicum*. а – внешний вид личинки, растровая электронная микроскопия; б – выброшенные из стенки тела личинки скопления от одного до семи фрагментированных ядер, каждое из которых окружено сморщенной плазматической мембраной, а все скопление целиком окружено кутикулой, электронограмма; в – нормально развитые интраэпидермальные околоплоточные коннективы, электронограмма; г – клетки покровного эпидермиса выглядят вздутыми и набитыми рыхлой тканью, мембраны клеток формируют многочисленные фестончатые складки, а по периферии клеток располагаются участки или целые апоптотирующие ядра, электронограмма. ag – аппарат Гольджи, an – апоптотические ядра, са – щетинки аннулы, со – щетинки первого сегмента опистосомы, cu – кутикула, eg – электронно плотные включения, f – кутикулярный киль уздечки, fr – передняя часть, fpl – сморщенная плазмалемма, lc – рыхлая (сетчатая или волокнистая) цитоплазма, li – липидные капли, m – мезотрох, mi – микровилли, n – невротрох (вентральная ресничная полоска), ne – нейриты, o – первый сегмент опистосомы, p – прототрох, pe – перистомииум, pl – плазмалемма, pr – простомииум, ru – пигидий, tb – зачаток щупальца, tr – туловищный сегмент.

лиферацию клеток спинного мезентерия. Эти многочисленные клетки заселяются бактериями и формируют трофосому. При этом эпидермис и все внутренние ткани, через которые бактерии проникали внутрь тела, претерпевают апоптоз

[7]. Таким образом, у вестиментифер процессы проникновения бактерий и обновления тканей путем апоптоза происходят одновременно. При этом кишка практически полностью деградирует и перестает функционировать, а трофосома фор-

мируется *de novo* из тканей мезодермального происхождения.

Наши данные показывают, что у предметаморфозных оседающих личинок френулятных погонофор *S. fiordicum* ткани покровов, мускулатуры и целотелия претерпевают апоптотические процессы, часть ядер фрагментируются и лизируются внутри клеток эпидермиса, другая часть апоптотических ядер выбрасывается наружу. Цитоплазма клеток заполняется рыхлым веществом, а большинство клеточных органелл разрушается. Бактерии в покровах на этой стадии не обнаруживаются. Мы предполагаем, что у френулятных погонофор апоптотические процессы в эпидермисе и мезодермальных тканях предшествуют заселению тканей потенциальными бактериальными симбионтами.

При этом эндодермальные ткани сохраняют свое личиночное состояние: клетки личиночной кишки заполнены желтком и не претерпевают никаких изменений. Рот и анус имеются, но не связаны с кишкой. Это может свидетельствовать о том, что личинка использует кишку не для потребления новых веществ извне через рот, а как депо желтка, доставшегося от материнского организма. Анатомия пищеварительного тракта, целостность кишечного эпителия, а также отсутствие в кишке бактериальных симбионтов могут свидетельствовать, что проникновение бактерий происходит не алиментарно, а через покровы, как это было описано у личинок вестиментифер.

Таким образом, у френулятных погонофор, которые являются сестринской группой по отношению к другим зибоглинидам, деградация покровов и мускулатуры предшествует заселению бактериями тела личинок. Сравнение процесса заражения погонофор и вестиментифер показывает, что у вестиментифер, которые в эволюции произошли позже, проникновение бактерий, обновление тканей, через которые происходила заражение бактериальными симбионтами, и начало формирования трофосомы в теле личинки происходят одновременно.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубокую благодарность Н.Е. Будаевой и сотрудникам Морской биологической станции Эспегренд (Университет Бергена, Норвегия) за помощь в сборе погонофор.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование поддержано грантом РНФ 20-74-10011.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, проводимые в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения или принятой практике для таких исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ivanov A.V.* Pogonophora (The Pogonophorans), Fauna of the USSR, new series // 1960. Academy of, V. 75.
2. *Rousset V., Rouse G.W., Siddall M.E., Tillier A., and Pleijel F.* Cladistics 18S rRNA, 28S rRNA and morphological data. // Cladistics. 2004. V. 20. P. 518–533.
3. *Struck T.H. et al.* Phylogenomic analyses unravel annelid evolution. // Nature. 2011. V. 471. P. 95–98.
4. *Li Y. et al.* Phylogenomics of tubeworms (Siboglinidae, Annelida) and comparative performance of different reconstruction methods. // Zool. Scr. 2017. V. 46. № 2. P. 200–213.
5. *Hilário F. et al.* New perspectives on the ecology and evolution of siboglinid tubeworms. // PLoS One. 2011. V. 6. № 2.
6. *Feldman R.A., Black M.B., Cary C.S., Lutz R.A., and Vrijenhoek R.C.* Molecular phylogenetics of bacterial endosymbionts and their vestimentiferan hosts. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1997. V. 6. № 3. P. 268–277.
7. *Nussbaumer A.D., Fisher C.R., and Bright M.* Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. // Nature. 2006. V. 441. № 7091. P. 345–348.
8. *Southward E.C.* Development of perviata and vestimentifera (pogonophora). // Hydrobiologia. 1999. V. 402. P. 185–202.
9. *Bakke T.* Development of *Siboglinum fiordicum* Webb (Pogonophora) after metamorphosis. // Sarsia. 1977. V. 63. № 2. P. 65–73.
10. *Rimskaya-Korsakova N. et al.* Myogenesis of *Siboglinum fiordicum* sheds light on body regionalisation in beard worms (Siboglinidae, Annelida). // Front. Zool. 2021. V. 18. № 1. P. 1–24.

АПОПТОТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРЕДЕДУЮТ ИНФЕКЦИОННОМУ ЗАРАЖЕНИЮ ЛАРВ ПОГОНОФОРОВ (СИБОГЛИНИДЫ, ЧЛЕНОКООЗЫ)

N. N. Rimskaya-Korsakova^{a,#}, E. N. Temereva^a, and Academician of the RAS V. V. Malakhov^a

^a Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

[#] e-mail: nadezdarkorsakova@gmail.com

The fine structure of the body wall and gut in competent larvae of the frenulate pogonophoran *Siboglinum fiordicum* for the first time was studied. The phenomenon of mass apoptosis of the nuclei of cells of the epidermis, musculature, and coelomic epithelium, for the first time was shown. Apoptotic nuclei were found in the cytoplasm of cells and outside of the larval body. In the latter case, each nucleus is surrounded by a plasmalemma, and the entire cluster is covered by a cuticle. The cells of the larval gut retain the usual structure: their cytoplasm is filled with numerous yolky granules, and the nuclei have the usual state. Similar apoptotic processes which is previously described in vestimentiferans were initiated by the penetration of symbiotic bacteria through the integument into the dorsal mesenterium. Probably, in *S. fiordicum*, the process of apoptotic rearrangement of body wall cells and the formation of a unique symbiosis with bacteria are time-spaced and do not happen simultaneously, as in vestimentiferans, but sequentially.

Keywords: frenulate pogonophorans, trophosome, symbiotic bacteria, infection, Siboglinidae, Frenulata