

УДК 591.182

Рубрика 34.33.15

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ОРГАНИЗАЦИИ НЕРВНОЙ И МЫШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ МАНТИИ БРАХИОПОДЫ *HEMITHIRIS PSITTACEA* (RHYNCHONELLIFORMEA: RHYNCHONELLIDA)

MORPHO-FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE ORGANIZATION OF THE NERVOUS AND MUSCULAR SYSTEM OF THE MANTLE OF THE BRACHIOPOD *HEMITHIRIS PSITTACEA* (RHYNCHONELLIFORMEA: RHYNCHONELLIDA)

**Ратновская Анна Владимировна<sup>1</sup>, Кузьмина Татьяна Валерьевна<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва*

<sup>2</sup> *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва*

**Ratnovskaya Anna Vladimirovna<sup>1</sup>, Kuzmina Tatiana Valerievna<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

<sup>2</sup> *M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow*

## **Введение**

Брахиоподы (Brachiopoda) – тип бентосных морских беспозвоночных животных с богатой палеонтологической историей. Мягкое тело брахиопод покрыто минерализованной двустворчатой раковиной, которая защищает животное. Тип Brachiopoda разделяется на три подтипа - Linguliformea, Craniiformea и Rhynchonelliformea. Представители подтипа Linguliformea закапываются в грунт, а представители подтипов Craniiformea и Rhynchonelliformea прикреплены к субстрату или неподвижно лежат на нем. Мягкое тело брахиопод занимает около трети пространства между створками раковины, остальная часть приходится на мантийную полость, окруженную мантией - выростом стенки тела, синтезирующим раковину. В мантийной полости расположен щупальцевый орган лофофор, который в первую очередь участвует в фильтрации пищевых частиц и дыхании. Мантийная складка состоит из внутреннего и наружного эпителия. По краю мантии в области перехода внутреннего эпителия в наружный находится мантийный желобок. Наружный эпителий подстилает раковину и синтезирует ее, в то время как внутренний ресничный эпителий участвует в очищении мантийной полости от ненужных частиц, а также в регуляции потоков воды в мантийной полости. По краю мантии располагаются щетинки, которые у брахиопод в первую очередь выполняют сенсорную функцию. Во время фильтрации створки раковины брахиопод приоткрыты, а щетинки располагаются за пределами мантийной полости. Механическое раздражение чувствительных элементов края мантии вызывает сокращение мантии и схлопывание створок раковины. Вплоть до настоящей работы не была известна организация мышечной и нервной системы мантии ринхонеллифорных брахиопод, а также способ реализации сенсорной функции щетинок мантии. В данной работе комплексом современных методов проведен морфо-функциональный анализ мышечной и нервной систем мантии брахиоподы *Hemithiris psittacea* (Gmelin, 1791).

## Материал и методы

Материалом для настоящей работы послужили взрослые особи замковой брахиоподы *Hemithiris psittacea* (Gmelin, 1790), собранные в августе 2021 года сотрудниками водолазной службы Беломорской биологической станции МГУ методом ручного сбора в Кандалакшском заливе Белого моря в окрестностях ББС МГУ на глубине 9 м. Животные были перевезены на Биологический факультет МГУ и содержались в аквариуме с искусственной морской водой при температуре 6-9° С.

Для изучения тонкого строения мантии методами трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) были вырезаны небольшие кусочки края мантии без раковины (объемом около 3 – 5 мм<sup>3</sup>). Материал был расслаблен в 3,5%-ном растворе хлорида магния и затем зафиксирован в 2,5%-ном растворе глутаральдегида на фосфатном буфере (рН 7,2) с добавлением сахарозы (100 мМоль/литр). После отмывки в буфере кусочки были дополнительно фиксированы 1%-м раствором четырехокси осмия по стандартной методике. Затем материал был обезвожен в спиртах возрастающей концентрации, пропитан и заключен в смесь смолы SPUR. Ультратонкие срезы, контрастированные уранилацетатом и цитратом свинца, были изучены на трансмиссионных электронных микроскопах JEOL JEM-1011 в Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета МГУ и в Центре коллективного пользования электронной микроскопии ИБВВ им Папанина РАН. Для обработки полученных электронных микрофотографий был использован программный пакет Adobe Photoshop CS6 (Adobe World Headquarters, San Jose, CA, USA).

Для изучения строения мантии методом иммуноцитохимии в сочетании с конфокальной лазерной микроскопией отдельные створки животных с мантией были расслаблены в 3,5%-ном растворе хлорида магния, затем зафиксирован 8 часов в 4%-ном параформальдегиде на фосфатном буфере, отмыт в фосфатном буфере с добавлением Triton X-100 (2%) Sigma 93443 (PBT) три раза по 15 минут. Затем материал был помещен на 24 часа в 10% альбумин бычьей сыворотки (BSA Sigma A2153) на PBT, инкубирован в течение 12 часов первичными антителами к серотонину 5HT-Rabbit Sigma S5545 (1:5000) и к тубулину Mouse Sigma SAB 4200776 (1:700). Далее материал был отмыт от первичных антител в PBT и инкубирован в течение 12 часов во вторичных антителах goat anti-Rabbit Alexa Fluor 546 (1:1000) и goat anti-Mouse Alexa Fluor 647 (1:1000) (Thermo Fisher Scientific). Затем материал был отмыт в фосфатном буфере и окрашен фаллоидином Phalloidin-FITC-495 Sigma P5282 (1:100) и DAPI Sigma D9542 (1:1000) по стандартной методике (Бисерова, 2013). Материал был снят на конфокальном лазерном микроскопе Nikon Eclipse Ti (Nikon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) в Межкафедральной лаборатории конфокальной микроскопии Биологического факультета МГУ. Съемка велась при длине волн 546 нм (для вторичных антител на серотонин), 647 нм (для вторичных антител на тубулин), 488 нм для фаллоидина и 405 нм для DAPI. Z-проекции полученных стэков были сделаны при помощи Image J 1.43 software.

Для проведения экспериментальной части работы у животного удаляли вентральную створку и руки лофофора, оставляли не менее чем на 30 минут в морской воде для адаптации. По окончании периода адаптации оказывали точечное механическое воздействие равной величины на край мантии. Полученный результат фиксировали на камеру Leica DFC420. Для получения изолированного препарата периферического отдела мантии отсекали радиальные нервы у основания мантии. Полученные данные обрабатывали с помощью программы ImageJ 1.43 software.

## Результаты

**Организация мышечной системы мантии.** Мускулатура расположена в соединительной ткани между внутренним и наружным эпителием и представлена серией мышц, которые тянутся в продольном направлении от центральной части мантии к ее периферии, но не доходят до мантийного края. Мантийные мышцы проходят рядом с базальной частью фолликулов щетинок, окончания мышечных отростков подходят к кольцевому мантийному нерву не менее, чем на 0,5 мкм. Мантийные мышцы могут быть представлены пучком из 2-3 мышечных отростков или отдельными мышечными отростками. Мышечные пучки и отдельные отростки расположены в несколько слоев в соединительной ткани мантии. Мышечная клетка разделяется на сому, в которой содержатся основные клеточные органеллы, а также длинные сократимые отростки, содержащие миофиламенты. Сомы клеток содержат крупное ядро вытянутой формы, а также крупные митохондрии и развитый гладкий и гранулярный ЭПР. Мышечные отростки полностью заполнены миофиламентами. Диаметр толстых миофиламентов на поперечном срезе через одну мышечную клетку варьирует, из чего следует, что толстые миофиламенты имеют веретенообразную форму, поскольку на срезах располагаются как более тонкие концевые участки миофиламентов, так и их наиболее широкая средняя часть. Максимальное значение диаметра толстых миофиламентов – 71 нм, что показывает наличие парамиозиновых волокон. Каждый мышечный отросток или пучок окружен тонким слоем плотного внеклеточного матрикса, к которому прикрепляется серией гемидесмосом. Нами не было обнаружено клеточных контактов между мышечными отростками в одном пучке.

**Организация нервной системы мантии.** От подглоточного ганглия отходят мантийные нервы, которые заходят в мантийную складку и формируют радиальные нервы. Радиальные мантийные нервы тянутся к краю мантии, при этом они сильно ветвятся и формируют анастомозы. Дистальные участки мантийных нервов проходят вдоль фолликулов щетинок и впадают в кольцевой нерв мантии. Кольцевой нерв идет вдоль всего края мантии и располагается у основания мантийного желобка. Мантийные нервы *H. psittacea* проходят в базальной части наружного и внутреннего мантийного эпителия. Кольцевой мантийный нерв также располагается базиэпителиально во внутреннем эпителии мантии у основания мантийного желобка. Кольцевой и радиальные нервы содержат перикарии и многочисленные нервные отростки. Перикарии содержат электронно-светлую цитоплазму, крупное ядро неправильной формы с ядрышком, митохондрии, гранулярный ЭПР, а также небольшое количество везикул с электронно-плотным центром и светлым ободком. Среди перикариев располагаются нервные отростки двух типов. Отростки первого типа наиболее многочисленны и содержат электронно-светлую цитоплазму, микротрубочки, также редкие везикулы с электронно-плотным центром и электронно-светлым ободком, их размер варьирует от 100 нм до 500 нм. Нервные отростки второго типа более крупные, их диаметр составляет от 500 нм до 1000 нм у взрослых особей. Нервные отростки второго типа заполнены электронно-плотной цитоплазмой и содержат электронно-светлые везикулы, а также многочисленные везикулы с электронно-плотным центром и электронно-светлым ободком.

Рядом с основанием щетинок располагаются воротничковые рецепторы. В апикальной части этих клеток располагаются 9 микроворсинок специфической формы, которые окружают расположенный в центральной части жгутик. Данные клетки соединены с соседними клетками адгезивными контактами в апикальной части. Базальная часть рецепторных клеток подходит к кольцевому нерву.

Мантийные нервы выявляют иммуноцитохимическую реакцию к серотонину. Также нервная система мантии окрашивается глиоксиловой кислотой, что показывает присутствие в нервной системе катехоламинов.

## Реакция края мантии на механическое воздействие

В данной работе мы исследовали сократительную реакцию дорсальной мантии, вызванную механическим раздражением у брахиопод с удаленной вентральной створкой.

Вскрытие и удаление вентральной створки раковины приводит к генерализованной равномерной ретракции края дорсальной мантии. При этом сокращение мантии сопровождается втягиванием щетинок внутрь мантийной полости. Через 30-60 минут после манипуляции дорсальная мантия релаксирует, в результате чего край мантии достигает края раковины, а щетинки выходят за пределы мантийной полости. Точечное механическое воздействие приводит только к локальной ретракции сегмента края мантии. Повторное точечное механическое воздействие приводит к кумуляции сократительной реакции: ретракция того же сегмента края мантии увеличивается на  $50 \pm 25\%$ .

В экспериментах с изолированным периферическим участком мантии реакция на механическое воздействие сохраняется, как и в мантии, сохраняющей связь с подглоточным ганглием.

В обоих типах экспериментов наибольшая величина локальной ретракции в ответ на точечное механическое воздействие наблюдается в передней части мантии (у переднего края раковины); минимальная амплитуда – в латеральных участках края мантии.

При увеличении площади одновременного воздействия вся мантия переходит в состояние частичного напряжения. Одиночное воздействие на пучок щетинок не приводит к реакции. При синхронном механическом воздействии на сегмент края мантии большей чем  $1/3$  ее периметра наблюдается генерализованная ретракция.

## Обсуждение

Схлопывание створок раковины является естественной защитной реакцией на механическое воздействие. Ретракция края мантии является необходимым элементом защитного рефлекса. Для успешной реализации двух указанных выше явлений необходима синхронизация и интеграция сокращений мышц-замыкателей и мускулатуры мантии. Можно предположить, что радиальные нервы мантии вовлечены в сопряжение ретракции мантии и схлопывание створок. Тем не менее наши эксперименты указывают на возможность автономного сократительного ответа и автономность ретракции края мантии. Локальная, т.е. независимая от возбуждающих воздействий со стороны подглоточного ганглия, сократительная реакция может реализовываться посредством двух нейрональных механизмов, включая аксон-рефлекс или передачу возбуждения через периферический нейрон. Наличие крупного кольцевого нервного тяжа на периферии мантии подкрепляет предположение о вовлеченности периферических нейронов в опосредование локальных сократительных ответов.

Как указано выше, мантия может находиться в сокращенном состоянии длительное время. Эта особенность с большей вероятностью обусловлена особой организацией толстых миофиламентов с большим количеством парамиозина в мантийных мышцах, чем тонической секрецией нейромедиаторов нервными клетками. Поскольку не обнаружено прямых контактов между мышечной и нервной клетками, мы предполагаем, что активация мышечных клеток может происходить классическим способом в результате вызванной секреции нейромедиаторов во внеклеточный матрикс, а не в результате электро-тонического воздействия через щелевые контакты.

## **Финансирование**

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-14-00020.