

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Воробьева Ольга Александровна

**Строение и возможный механизм функционирования
книдосаков голожаберных моллюсков (Nudibranchia)**

1.5.12 – зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научный руководитель** — *Малахов Владимир Васильевич, доктор биологических наук, академик РАН, профессор.*
- Официальные оппоненты**
- *Кантор Юрий Израилевич, доктор биологических наук, Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова, лаборатория морфологии и экологии морских беспозвоночных, ведущий научный сотрудник*
 - *Мокиевский Вадим Олегович, доктор биологических наук, Институт океанологии им. П.П. Шишова Российской академии наук, лаборатория экологии прибрежных донных сообществ, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории*
 - *Чабан Елена Михайловна, кандидат биологических наук, Зоологический институт Российской академии наук, лаборатория морских исследований, старший научный сотрудник*

Защита диссертации состоится « 9 » октября 2023 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.8 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, ауд. М1.

Е-mail: ksenperf@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.8/2575>

Автореферат разослан « ___ » _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



К.С. Перфильева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Приобретение облигатных внутриклеточных эндосимбионтов и формирование химерных организмов – характерная особенность эукариот. Именно благодаря многочисленным эндосимбиозам возникло то биологическое разнообразие эукариот, которое мы наблюдаем на современном этапе развития биосферы (Cavalier-Smith, 2002). Изучение механизмов и закономерностей этих процессов является одним из основополагающих фундаментальных направлений современной биологии. Приобретение внутриклеточных эндосимбионтов играет важную роль в эволюции многоклеточных животных. Среди примеров можно отметить, например, симбиоз кораллов и зооксантелл, и симбиоз аннелид, моллюсков и других беспозвоночных с хемосинтетическими бактериями в гидротермальных очагах и восстановительных биотопах (Muller-Parker et al., 2015; Nussbaumer et al., 2006).

В некоторых группах многоклеточных в качестве эндосимбионтов выступают не сами клетки других организмов, а клеточные органеллы, полученные от пищевых объектов. Это интересное биологическое явление встречается у представителей нескольких типов животного царства. Представители отряда *Nudibranchia*, питающиеся стрекающими кишечнорастворительными способны отбирать и культивировать клептокниды – стрекательные капсулы своих жертв, которые используются для защиты самого хищника. Для данного процесса характерна высокая степень функциональной интеграция тканей хозяина и чужеродных органелл с формированием специализированных органов (книдосаков) со сложной иннервацией, а также развитие соответствующих поведенческих паттернов.

Загадочное явление клептокнидии было открыто еще в XIX веке (Alder, Hancock, 1845; Bergh, 1862), но до сих пор это направление исследований является слабо разработанным. Исследования современных авторов (Greenwood, Mariscal, 1984; Martin, 2003; Martin et al., 2009; Goodheart et al., 2018 и др.) помогли понять роль стрекательных капсул (нематоцист) в оборонительной системе голожаберных моллюсков. Тем не менее, ряд важных вопросов, таких как конкретный механизм выстреливания нематоцист, возможный механизм защиты моллюска от поражения нематоцистами, механизм селекции нематоцист остаются недостаточно изученными. Требуется дополнительных исследований проблема разнообразия строения книдосаков в пределах *Nudibranchia*. Вплоть до настоящего времени нет понимания того, каким образом строение книдосаков связано с экологией конкретных видов моллюсков, а также какое филогенетическое значение имеет строение книдосаков и как оно соотносится с современными представлениями о системе голожаберных моллюсков. Заслуживает специального внимания почти неисследованный феномен совмещения двух биологических явлений – клептокнидии и одновременного культивирования симбиотических зооксантелл, которое встречается в отдельных группах *Nudibranchia*.

Цели и задачи работы. Целью работы является изучение организации кнidosаков голожаберных моллюсков в функциональном и сравнительном аспектах.

В работе были поставлены следующие задачи: (1) провести детальную реконструкцию организации кнidosаков на световом и ультраструктурном уровнях модельного объекта *Aeolidia papillosa*; (2) исследовать особенности клеточной дифференцировки на ультраструктурном уровне, а также изучить пролиферативную активности клеток различных зон кнidosака у модельного объекта *Aeolidia papillosa*; (3) исследовать механизм выстреливания кнidosаков и предложить модель его функционирования; (4) провести сравнительно-морфологический анализ организации кнidosаков в основных филогенетических линиях семейств Aeolidiidae, Fionidae, Facelinidae и Myrrhinidae в связи с особенностями питания; (5) исследовать морфологические адаптации к одновременному культивированию клептокнид и симбиотических зооксантелл у голожаберных моллюсков семейства Facelinidae.

Научная новизна. Впервые изучено тонкое строение дистальных частей церат, а также ультраструктура клеток выстилки пролиферационной зоны, зоны книдофагов, зоны книдопора, мышечной выстилки кнidosака и цераты 18 видов семейств Aeolidiidae, Fionidae, Facelinidae, Myrrhinidae, изучена пролиферационная активность клеток кнidosака, выявлены особенности ультраструктурной организации клеток покровного эпителия церат. Впервые детально исследован механизм функционирования кнidosаков и способы защиты тканей моллюска от поражения клептокнидами.

Впервые показана корреляция между особенностями тонкой морфологии кнidosака и экологическими характеристиками моллюсков: механизмами пищедобывания и объектами питания.

Впервые исследованы морфологические адаптации к культивированию симбиотических зооксантелл у представителя Nudibranchia *Pteraeolidia semperi*, обладающего кнidosаками и клептокнидами.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты работы раскрывают особенности загадочного и слабо изученного биологического явления – заимствования одним видом клеточных органелл другого вида из весьма удаленного таксона, культивирование органелл чуждого вида в цитоплазме собственных клеток и использовании органелл чуждого вида для собственной защиты. Это открывает перспективы для последующих исследований динамики и особенностей селективного отбора чужеродных органелл, что позволит решать принципиально новые задачи, связанные с изучением клеточного сигналинга и рецепторных систем «свой-чужой».

Полученные результаты представляют собой новый этап в понимании взаимоотношений видов в биологических сообществах в аспекте взаимоотношений в системе «хищник-жертва». Результаты работы вносят вклад в понимание эволюционных процессов и имеют важное значение для понимания эволюционных процессов в типе моллюсков и их адапционных

возможностей. Полученные результаты внедрены в лекционные курсы по зоологии беспозвоночных и сравнительной анатомии беспозвоночных и могут быть использованы в курсах по цитологии и теории эволюции.

Методология и методы диссертационного исследования. В диссертационной работе использован комплексный подход к исследованию биологического явления клептокнидии на различных уровнях организации – ультраструктурном, гистологическом, анатомическом, морфологическом. Методология работы включает анализ исследуемого биологического явления как в функциональном, так и в эволюционном аспектах. В работе применены методы анализа научной литературы, комплексного применения широкого спектра методик морфологического исследования, сочетания детального исследования модельного объекта с изучением в сравнительном аспекте широкого круга видов, представления оригинальных результатов в хорошо документированном и наглядном виде, позволяющим провести экспертизу достоверности исследования, сопоставления оригинальных результатов исследования с ранее полученными данными, формулировки результатов исследования в виде кратких выводов, отражающих основные результаты исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Новые представления о плане строения кнidosака *Nudibranchia*, особенностей дифференцировки и пролиферативной активности клеток его выстилки, цитологических особенностях книдофагов, организации мышечной и нервной системы кнidosака.
2. Новые представления о функционировании кнidosака голожаберных моллюсков и механизме выстреливания клептокнид.
3. Новые данные об организации апикальных частей цераты, цитологических особенностях ее эпидермиса и способах защиты от поражения собственных тканей клептокнидами.
4. Сравнительно-морфологический анализ организации кнidosаков в основных филогенетических линиях семейств *Aeolidiidae*, *Fionidae* и *Facelinidae* в связи с особенностями питания
5. Морфо-функциональный анализ феномена сочетания двух биологических явлений – клептокнидии и культивирования симбиотических зооксантелл у голожаберных моллюсков *Facelinidae*.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на следующих конференциях и научных семинарах:

1. 4th International Congress on Invertebrate Morphology (ICIM4) /IV Международный конгресс по морфологии беспозвоночных (Москва, Россия, 18-23 августа 2017);
2. XIII Всероссийская конференция "Изучение, рациональное использование и охрана природных ресурсов Белого моря" (Санкт-Петербург, Россия, 17-20 октября 2017);

3. Юбилейная конференция в честь 160-тилетия кафедры зоологии беспозвоночных «Зоология Беспозвоночных – Новый Век» (Москва, Россия, 19-21 декабря 2018);
4. Моллюски: биология, экология, эволюция и формирование малакофаун (Борок, Россия, 14-18 октября 2019).
5. Euromal 2021: 9th European Congress of Malacological Societies (Прага, Чехия, 5-9 сентября 2021);
6. Научный семинар «Современная зоология беспозвоночных» (Москва, Россия, 5 октября 2022).

Публикации. По материалам диссертации было опубликовано 5 статей в рецензируемых российских и международных журналах. Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. Автор проводила морфологические исследования, ставила научные задачи, анализировала полученные результаты и принимала активное участие в подготовке текста публикаций.

Личный вклад автора. Автор диссертации лично собирал материал, проводил фиксацию и обработку материала для гистологических и ультраструктурных исследований, лично проводил исследования с применением светового микроскопа, конфокального лазерного сканирующего микроскопа, трансмиссионного и сканирующего электронных микроскопов, проводил исследование пролиферативной активности и экспериментальные исследования механизма функционирования квидосака, анализировал полученные микрофотографии и собственноручно изготовлял рисунки и схемы, автор диссертации собрал и проанализировал большой объем литературы, включающий 168 источника, провел анализ собственных результатов, участвовал в подготовке текстов 5 статей в научных журналах, лично сделал 6 докладов на научных конференциях.

Структура диссертации. Текст работы изложен на 196 страницах и состоит из пяти глав: введение, обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение результатов, — выводов, списка литературы и приложений. Приложение включает 8 таблиц и 36 иллюстраций. Список литературы включает 168 источника, из которых 3 представлены русскоязычными источниками, а 165 — на иностранном языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во Введении обоснована актуальность темы исследования, показана степень ее разработанности, а также поставлены цели и задачи настоящего исследования.

Глава 1. Обзор литературы

Глава состоит из пяти разделов. В первом разделе освещены исторические аспекты изучения феномена клептокнидии (заимствование и использование

стрекательных капсул представителей типа Cnidaria другими типами животных: губки, гребневики, плоские черви и моллюски). Во втором разделе рассматривается распространенность способности к клептокнидии в отряде Nudibranchia (Gastropoda). Третий раздел посвящен сравнительной морфологии церат и книдосаков различных представителей Nudibranchia. В четвертом разделе освещены вопросы, касающиеся динамики процесса отбора клептокнид и особенностей функционирования клептокнид у различных представителей Nudibranchia. В пятом разделе дан обзор современных исследований процесса отбора и культивирования симбиотических зооксантелл голожаберными моллюсками.

Глава 2. Материал и методы

В первом разделе этой главы приводится справка о современном состоянии системы Nudibranchia, а также кратко дана система, используемая в работе.

Материалом для данной работы служили 18 видов голожаберных моллюсков, собранных в Баренцевом, Белом, Японском, Средиземном и Южно-Китайском морях. Материал был собран вручную на литорали или из верхней сублиторали с использованием легководолазного снаряжения.

Фиксация объектов проходила несколькими способами в зависимости от методов исследования, который был применен для изучения того или иного вида. Перед фиксацией часть особей была расслаблена. Для изучения общей и тонкой морфологии церат и книдосаков были использованы несколько методов исследования: гистологические методы и световая микроскопия, трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ). Для изучения строения книдосака модельного вида (*Aeolidia papillosa*) был использован полный спектр методов, для других видов часть методик (например, СЭМ, иммуноцитохимия) не была использована. Для изучения морфологических изменений выстреливших книдосаков моллюсков раздражали препаративной иглой, а затем сразу отрезали несколько церат с помощью ножниц. Отрезанные цераты немедленно помещались в подготовленные растворы для фиксации для световой микроскопии и для лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Также было проведено исследование пролиферативной активности клеток книдосака с использованием метки EdU.

Глава 3. Результаты

Строение и функционирование книдосаков *Aeolidia papillosa*. Книдосак представляет собой дивертикул пищеварительной железы. Он имеет грушевидную форму, с сужением на апикальном конце. В самом книдосаке *A. papillosa* можно выделить три морфологически различные части: зона пролиферации, зона книдофагов (фагоцитарных клеток, в цитоплазме которых содержатся нематоцисты (стрекательные капсулы книдарий) и зону книдопора (Рис.1). Книдосак соединяется с пищеварительной железой через узкий канал – перешеек (Рис. 1). Он выстлан узкими мультицилиарными

гастродермальными клетками. Апикальные части клеток практически смыкаются в центральной части перешейка, просвет заполнен ресничками. Зона пролиферации выстлана столбчатыми мультицилиарными клетками. Цитоплазма гомогенная, с большим количеством мелких включений, содержит митохондрии овальной формы, редкие фагосомы и комплексы Гольджи. Апикальная часть клетки несет реснички и многочисленные микроворсинки (Рис.1).

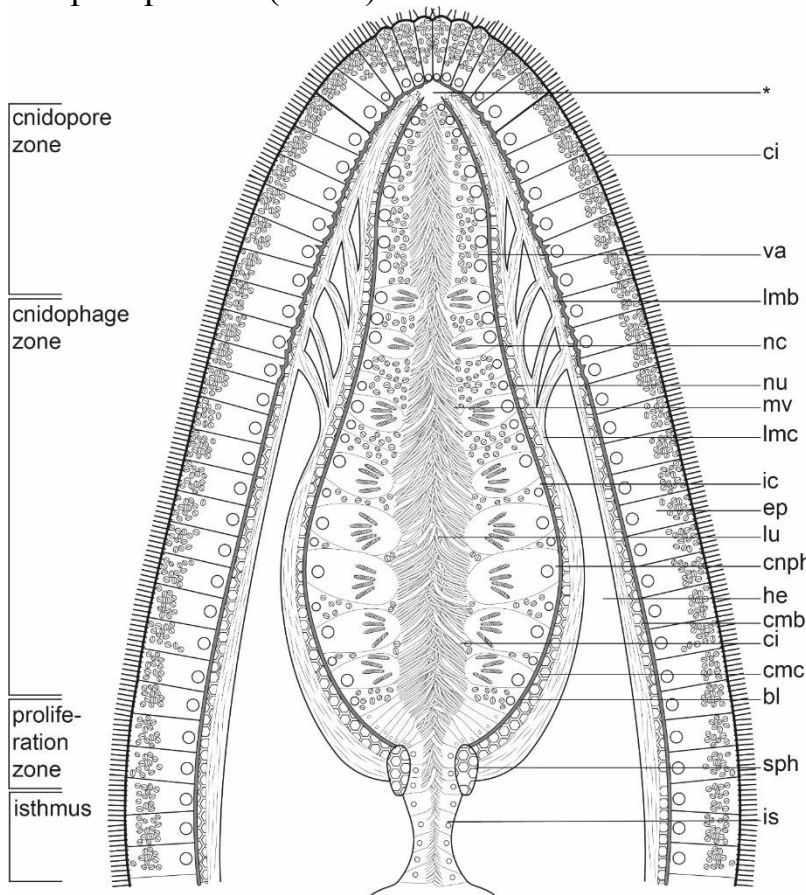


Рисунок 1. Схема продольного среза апикальной части цераты *A. papillosa* bl – базальная пластинка; ci – реснички; cmb – кольцевая мускулатура цераты; cmc – кольцевая мускулатура квидосака; cnph – квидофаги;; ep – эпидермис; he – гемоцель; ic – интерстициальные клетки; is – перешеек между дивертикулом пищеварительной железы и квидосаком; lmb продольная мускулатура цераты; lmc – продольная мускулатура квидосака; lu – просвет квидосака; mv – микроворсинки; nc – нематоцисты; nu – ядра; sph – сфинктер; sz – зона ресничного канала; va – вакуоли с хитиновыми веретенами; * – квидопор.

В составе гастродермальной выстилки зоны квидофагов выделяется два типа клеток: квидофаги и интерстициальные клетки (Рис.1, 2). Квидофаги – это крупные столбчатые клетки, в которых содержатся многочисленные нематоцисты, располагающиеся в центральной везикулярной области квидофага (Рис. 2). Нематоцисты окружены мембраной, плотно прилегающей к их оболочке. Между квидофагами располагаются интерстициальные клетки (Рис. 2 А). Как правило, они имеют форму песочных часов с расширенными апикальной и базальной частями и узкой средней частью, сжатой соседними квидофагами. В цитоплазме интерстициальных клеток имеются многочисленные вакуоли, содержащие хитиновые гранулы (Рис. 2 С).

Дистально располагается обособленная зона квидопора, мышечная обкладка квидосака в этом месте соединяется с мышечной стенкой цераты (Рис.1). Гастродермальная выстилка этой части квидосака представлена невысоким кубическим эпителием. Цитоплазма его клеток заполнена многочисленными вакуолями с хитиновыми гранулами. Просвет квидосака в зоне квидопора заполнен микроворсинками и ресничками, отходящими от апикальной части

гастродермальных клеток. Базальная пластинка, подстилающая эпидермис цераты, по направлению к ее дистальному концу постепенно истончается, становится волнистой и практически исчезает на самом апикальном конце в области книдопора (Рис. 1).

В полости гемоцеля цераты проходят мощные пучки нервных волокон. Нервные пучки входят в слой мускулатуры, окружающей кнidosак, где разделяются на более тонкие нервы.

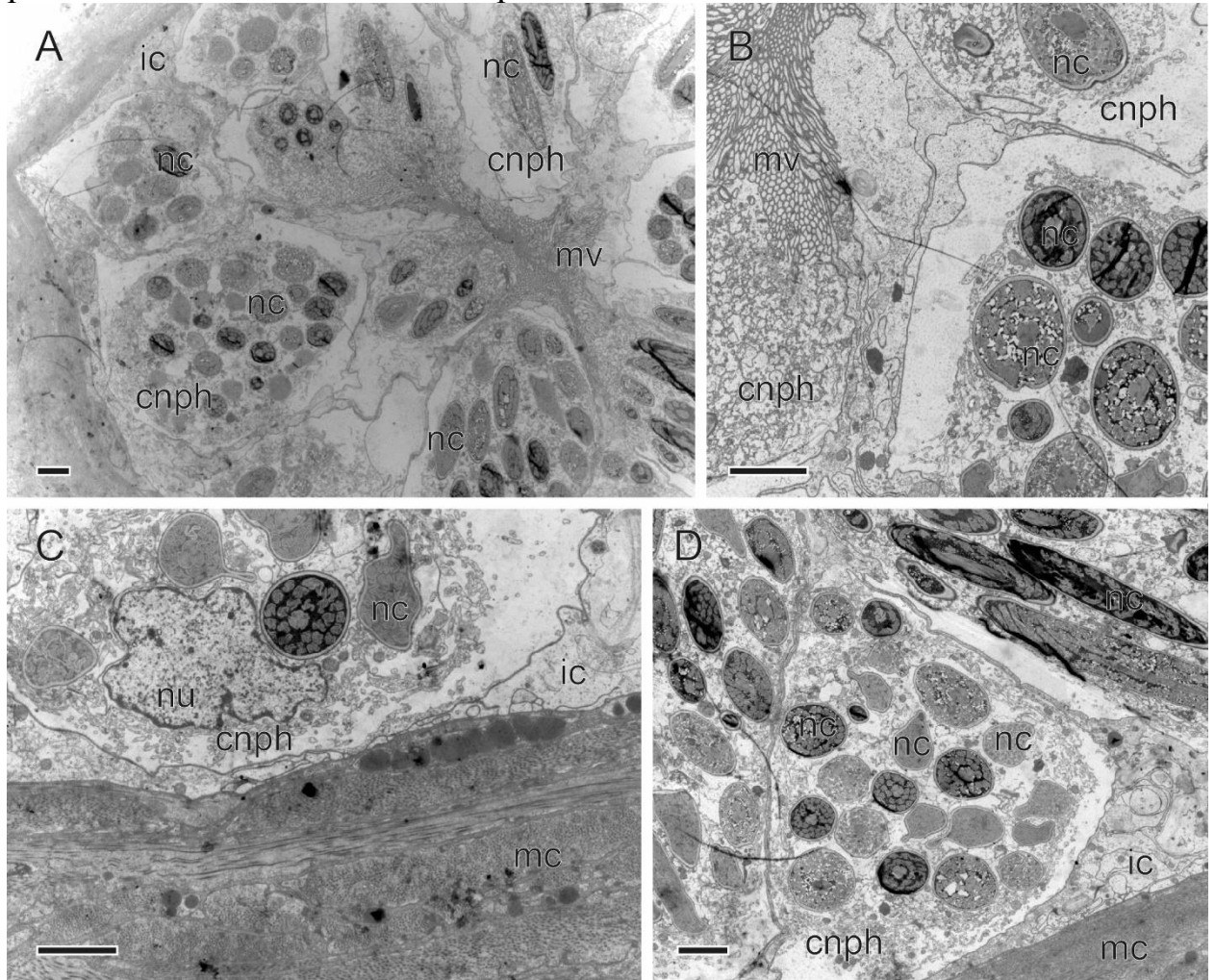


Рисунок 2. Зона книдофагов *A. papillosa*, поперечные ультратонкие срезы, ТЭМ. А – общий вид зоны книдофагов; В – участок просвета, заполненного микроворсинками и ресничками, и апикальные части клеток гастродермиса; С – базальная часть книдофага с ядром и участок прилегающей мышечной обкладки; D – книдофаг и базальная часть интерстициальной клетки. cnph – книдофаги; ic – интерстициальные клетки; mc – мышечная обкладка кнidosака; mv – микроворсинки; nc – нематоциты; nu – ядра. Масштабные линейки – 2 мкм.

При исследовании пролиферативной активности клеток гастродермальной выстилки кнidosака оказалось, что включение метки EdU происходит только в, так называемой, зоне пролиферации в базальной части кнidosака.

Цераты, зафиксированные непосредственно после экспериментального раздражения моллюска, имеют на апикальном конце кратерообразную воронку. Кнidosак непосредственно после выстреливания демонстрирует

утолщение его наружной мышечной обкладки, что говорит о сокращении мускулатуры кнidosака (Рис. 3).

Строение кнidosаков голожаберных моллюсков семейств *Aeolidiidae*, *Fionidae*, *Facelinidae*, *Myrrhinidae*

Кнidosак *Spurilla neapolitana* (*Aeolidiidae*) имеет вытянутую грушевидную форму с сужением на апикальном конце цераты. В кнidosаке выделяется три функциональные зоны: зона пролиферации, зона книдофагов и зона книдопора. Выстилка зоны кнidosака представлена двумя типами клеток: собственно, книдофаги и интерстициальные клетки. Последние не содержат вакуоли с гранулами хитина, в отличие от вида *Aeolidia papillosa*. Просвет кнidosака (люмен) очень узкий, заполнен большим количеством микроворсинок. Зона книдопора сформирована интерстициальными клетками.

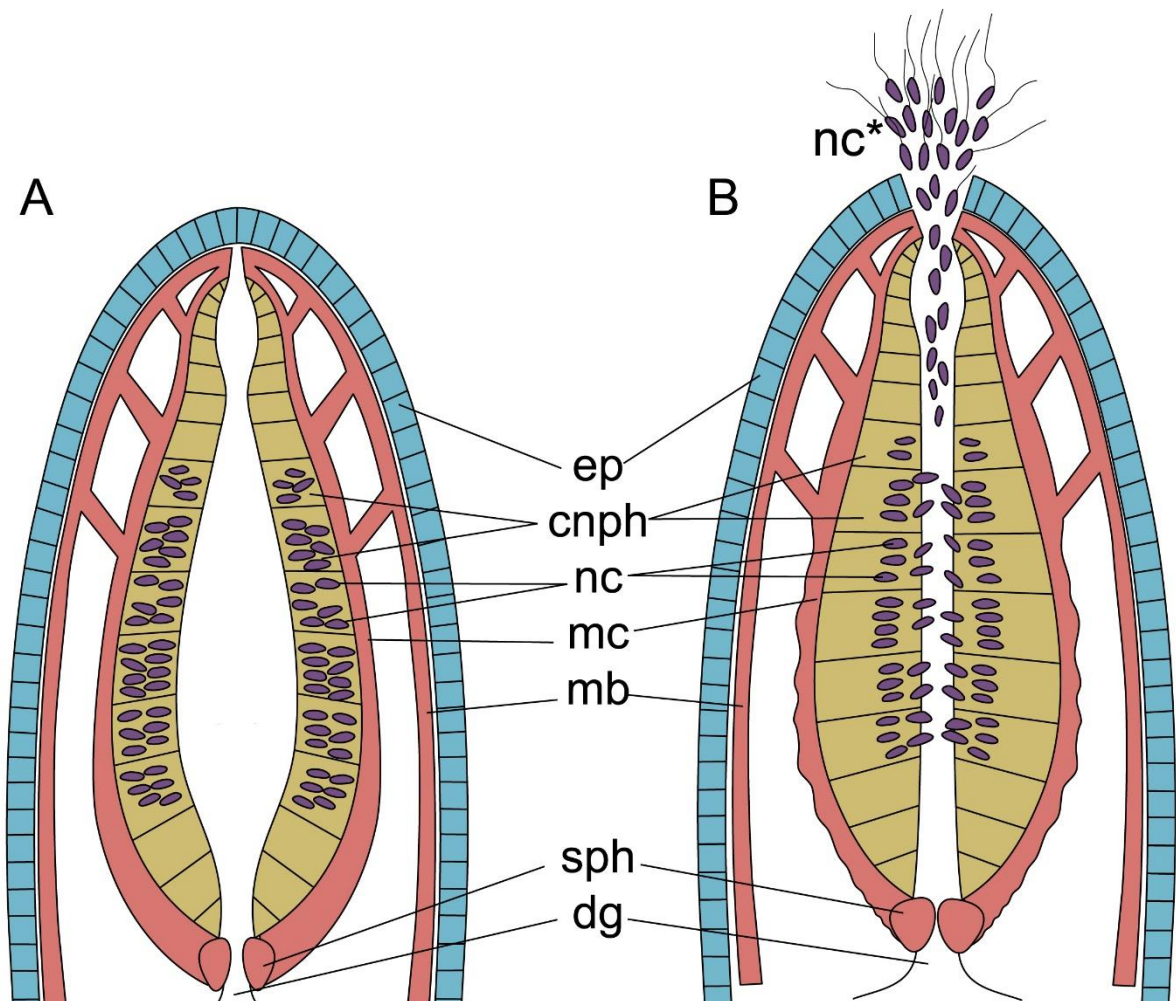


Рисунок 3. Схема выстреливания кнidosака голожаберных моллюсков. А – схема строения расслабленного кнidosака; В – схема строения выстрелившего кнidosака. Спнф – книдофаг; dg – пищеварительная железа; ep – эпидермис; nc – нематоциты; mb – мускулатура стенки тела; mc – мускулатура кнidosака; sph – сфинктер.

Кнidosаки видов семейства *Fionidae* характеризуется единым планом строения, в большинстве случаев не отходящим от общей схемы (Рис. 4).

Книдосак является продолжением выростов пищеварительной железы, во всех случаях на апикальном конце цераты имеется только один книдосак. Он образован продольным (наружным) и кольцевым (внутренним) слоями мускулатуры, которые соединяются с соответствующими слоями мускулатуры цераты в области книдопора (кольцевой слой прилегает к эпидермису, а продольный – к гемоцеллю). У некоторых видов мускулатура книдосака тонкая, отдельные слои не выражены. Книдосак фионид подразделяется на три функциональные области: зону пролиферации, зону книдофагов и зону книдопора (Рис. 4).

Книдосак соединяется с пищеварительной железой через узкий канал, окруженный мощным мышечным сфинктером. Зона пролиферации лежит рядом с входом книдосака. Зона книдофагов занимает основной объем книдосака и содержит книдофаги с нематоцистами разных типов, которые зависят от рациона моллюска. Расположение нематоцист внутри книдофагов сильно различается у представителей разных родов. У некоторых видов (*Cuthona nana*, *Catriona columbiana*, *Tergipes tergipes*, *Zelentia pustulata*) (Рис. 4 А, В, F, H) выстилка зоны книдофагов в книдосаке состоит из клеток одного типа (книдофаги), у других видов (у представителей рода *Cuthonella* и *Eubbranchus*) (Рис. 4 С, Е) могут быть обнаружены дополнительные типы клеток, такие как интерстициальные клетки и клетки с различными включениями. Просвет книдосака (люмен) хорошо развит у некоторых видов (*C. nana*, *T. tergipes*, *Z. pustulata*) и почти отсутствует у других (*C. columbiana*, *E. rupium*). У некоторых видов (*Z. pustulata*, *E. odhneri*) (Рис. 4 H) зона книдофагов продолжается до книдопора, что можно интерпретировать как «простой книдопор». У других видов встречается несколько модификаций: книдопор выстлан клетками без нематоцист (*D. viridis*, *T. ornata*, *E. rupium*, *Cuthonella hiemalis*) (Рис. 4 D, G, E) или представлен инвагинацией эпидермиса (*C. nana*, *C. columbiana*). Гемоцель в области книдосака Fionidae s.l. имеет ряд особенностей. Во всех случаях он содержит уникальный тип клеток, так называемые *cellules speciale sensu* Edmunds (1966). На ультраструктурном уровне они имеют крупное ядро, а цитоплазма заполнена гранулярным эндоплазматическим ретикулюмом. У всех исследованных видов, кроме представителей рода *Eubbranchus*, мы также обнаружили в гемоцеле клетки, содержащие вакуоли с хитиновыми гранулами.

Книдосаки представителей семейств Facelinidae, Myrhrinidae демонстрируют большое разнообразие строения, хотя в целом также соответствуют общему плану строения книдосаков эолид. Книдосак *Phyllodesmium poindimiei* (Myrhrinidae) представляет собой тонкостенный мешочек, клептокниды отсутствуют как в выстилке книдосака, так и в клетках выстилки кишечного дивертикула. Книдопор не заметен. Филлодесмиумы питаются восьмилучевыми кораллами, но, по-видимому, утратили способность к отбору и использованию клептокнид. Книдосак *Hermisenda crassicornis* (Myrhrinidae) крупный, вытянутый, имеет хорошо выраженную мышечную обкладку и подразделяется на три функциональные зоны. В книдофагах

содержится одна крупная эврителла и множество мелких мастигфор. Апикальная зона лишена книдофагов и ее просвет заполнен гомогенным материалом, вероятно представляющим микроворсинки гастродермальных клеток. Кнidosак *Muja longicornis* (Facelinidae) очень тонкостенный, большую часть его выстилки составляют крупные книдофаги с нематоцистами двух типов. Апикальная зона не выражена.

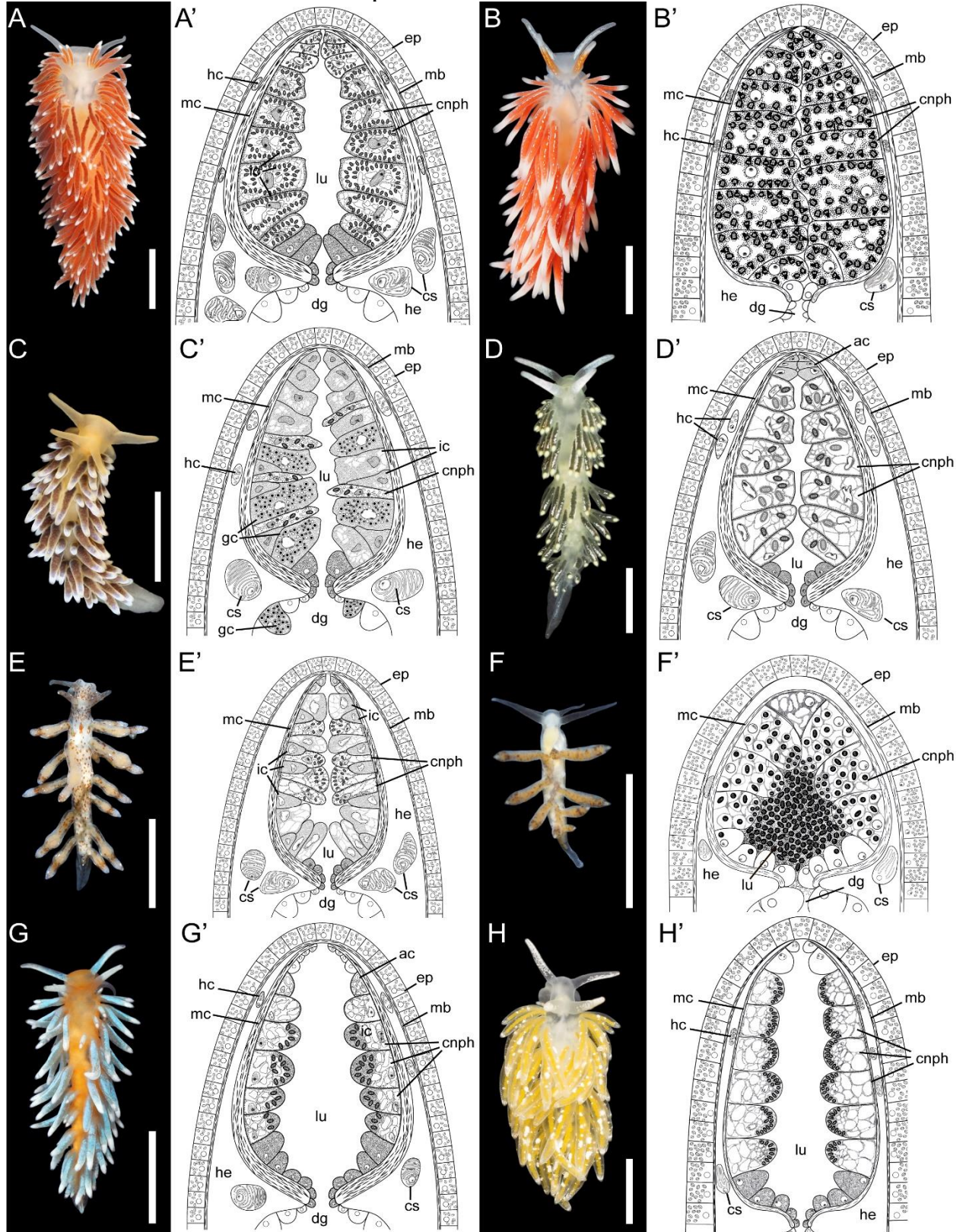


Рисунок 4. Общий вид представителей семейства Fionidae и обобщенные схемы строения кнidosаков этих видов. А – *Cuthona nana*. В – *Catriona columbiana*. С – *Cuthonella hiemalis*. D – *Diaphoreolis viridis*. Е – *Eubranchus rupium*. F – *Tergipes tergipes*. G – *Trinchesia ornata*. H – *Zelentia pustulata*. Abbreviations: ac – апоптогические клетки в зоне книдопора; cnph – книдофаги; cs – *cellules speciale*; dg – пищеварительная железа; ep – эпидермис; gc – клетки с гранулированным содержимым; hc – клетки с хитиновыми гранулами; he – гемоцель; ic – интерстициальные клетки; lu – люмен; mb – мускулатура стенки тела; mc – мускулатура кнidosака. Масштабная линейка: 5 мм.

Кнidosак *Pteraeolidia semperi* (Facelinidae) вытянутый и имеет очень мощную мышечную обкладку, образованную переплетением мышечных пучков, идущих в различных направлениях (Рис. 5). Кнidosак подразделяется на две части: расширенную базальную – зона книдофагов, и суженую апикальную – зона книдопора (Рис. 5 А, В). Клетки книды содержатся только в клетках-книдофагах гастродермальной выстилки расширенной части кнidosака. Каждый книдофаг содержит только одну нематоцисту. Особенностью данного вида является наличие гастродермальных тяжей, содержащих зооксантеллы. Гастродермальные тяжи прилегают к слою мускулатуры, подстилающей эпидермис, проникают между мышечными пучками и иногда прилегают изнутри к базальной пластинке эпидермиса (Рис. 5 С). Их клетки содержат в цитоплазме многочисленные зооксантеллы, часто образующие скопления. В живом состоянии зооксантеллы окрашены в желто-бурый цвет, что характерно для динофлагеллят, которые чаще всего являются симбионтами различных морских беспозвоночных). Благодаря этому и сами цераты, собранные в пучки на спинной стороне моллюска, также окрашены в оттенки бурого цвета.

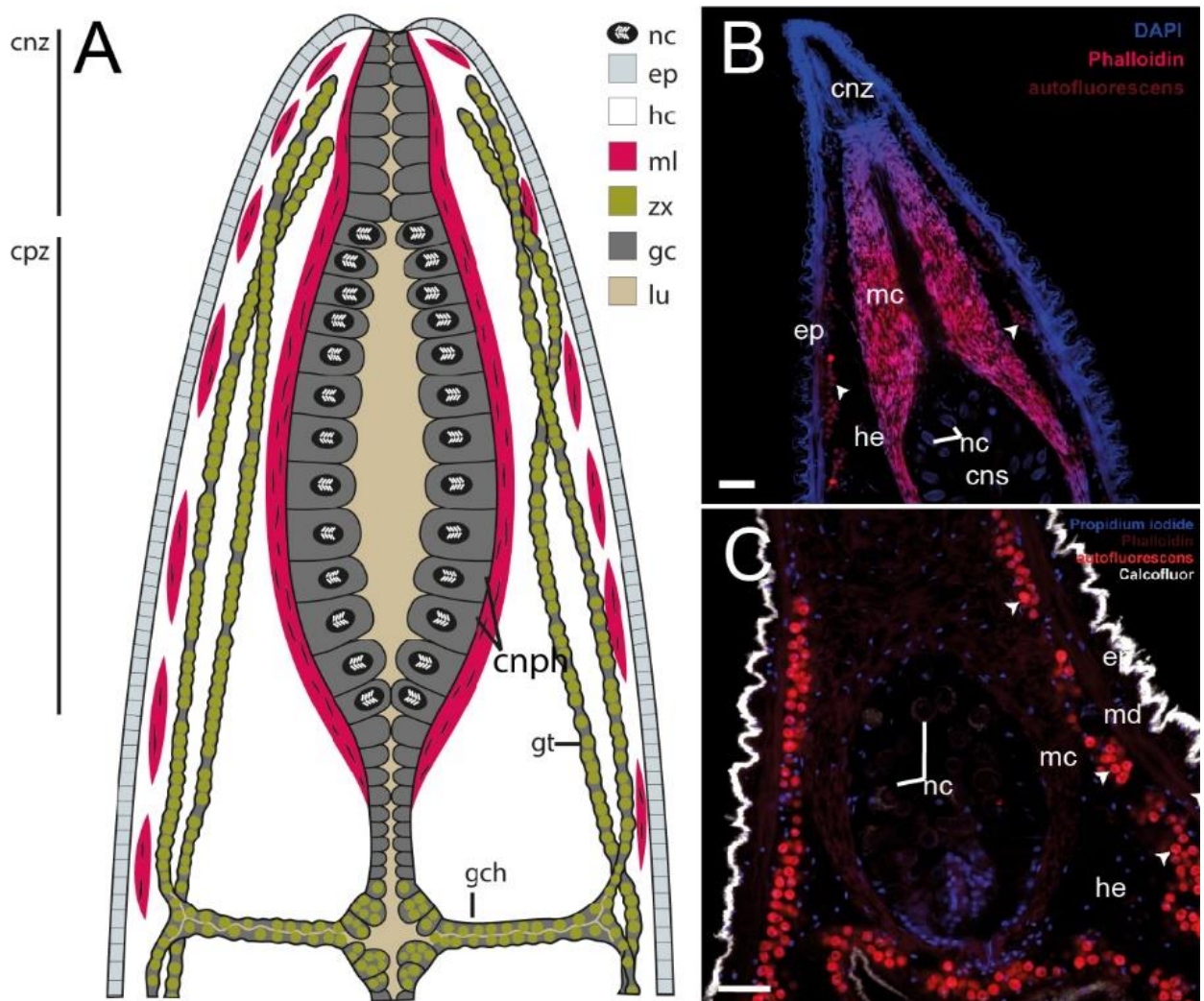


Рисунок 5. Строение апикальной части цераты *Pteraeolidia semperi*. А – схема строения апикальной части цераты; В – продольный оптический срез через вершину цераты, КЛСМ; С – зооксантеллы в гастродермальных каналах, продольный оптический срез, КЛСМ. Cnz – зона книдопора; cndp – книдофаг; cpz – зона книдофагов; ep – эпидермис; gch – гастродермальный канал; gt – гастродермальный тяж; hc – гемоцель; lu – просвет пищеварительной железы; mb – мускулатура стенки тела; mc – мускулатура книдосака; nc – клеточки книды в книдофагах; nc* – выстрелившие нематоцисты; zx – зооксантеллы в клетках пищеварительной железы. Масштабная линейка – 30 мкм.

Глава 4. Обсуждение результатов

Методологические аспекты изучения книдосаков и сопряженных структур. В диссертационной работе использован комплексный подход к исследованию биологического явления клеточекнидии на различных уровнях организации – ультраструктурном, гистологическом, анатомическом, морфологическом. Наше исследование демонстрирует, что современные методы (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, КЛСМ), а также классические электронно-микроскопические методы (трансмиссионная электронная микроскопия, ТЭМ) обеспечивают лучшее разрешение при визуализации структурных элементов внутри книдосака по сравнению с традиционными гистологическими методами. Кроме того, нами показано, что данные, полученные с помощью ТЭМ, подтверждают результаты полученные

с помощью как КЛСМ, так и гистологических исследований. Применение интегративного подхода к изучению кнidosаков с помощью методов гистологии, иммуноцитохимии и ТЭМ обеспечивает более целостное понимание морфологии и функционирования кнidosаков и позволяет на высоком уровне детектировать мельчайшие эволюционные и адаптивные изменения кнidosаков при переходе моллюсков на новые объекты питания.

Строение кнidosаков представителей семейства *Aeolidiidae*. Наши результаты показывают, что кнidosак *Aeolidia papillosa* представляет собой гораздо более сложную структуру, нежели предполагалось ранее на основании исследования строения кнidosаков различных видов моллюсков (Goodheart et al., 2018). Наши данные подтверждают предшествующие результаты о наличии узкого ресничного канала, соединяющего пищеварительную железу и кнidosак (Рис. 1). Выстилка этой зоны представлена недифференцированными эмбриональными ресничными клетками. Такая же эпителиальная выстилка наблюдалась в зоне пролиферации. Ультраструктура этих клеток (гомогенная цитоплазма, с небольшим количеством специфических включений) свидетельствует о низком уровне их дифференцировки. В то же время мечение EdU показывает высокий уровень пролиферативной активности этих клеток как в ресниччатом канале, так и в зоне пролиферации.

Выстилка кнidosака *Aeolidia papillosa* представлена двумя типами клеток: книдофагами и интерстициальными клетками (Рис. 2). Предположение о том, что интерстициальные клетки являются специфическими «эмбриональными» клетками, замещающими погибшие книдофаги, не подтверждается нашими данными, поскольку в зоне книдофагов не наблюдалось пролиферативной активности. Интерстициальные клетки представляют собой дифференцированные функциональные клетки со специфической ультраструктурой: эти узкие клетки чередуются с книдофагами и несут многочисленные вакуоли с хитиновыми гранулами. Вероятно, они несут опорную функцию для слоя книдофагов, а наличие хитиновых гранул может свидетельствовать об их защитной функции против выстреливания нематоцист.

Книдофаги *A. papillosa* также демонстрируют несколько специфических ультраструктурных особенностей. Клептокниды в книдофагах собраны в группы и окружены многочисленными везикулами, в то время как окружающий слой цитоплазмы электронно-прозрачный, в нем отсутствуют какие-либо клеточные органеллы (Рис. 2). Такая же структура показана для *Spurilla neapolitana*, филогенетически близкой к *A. papillosa*. Вероятно, плотная упаковка клептокнид обеспечивает более эффективное и совместное выстреливание при выбрасывании нематоцист из кнidosака. Просвет кнidosака представителей *Aeolidiidae* заполнен микроворсинками и ресничками, которые ориентированы одинаково в направлении книдопора. Мы предполагаем, что такая ориентация микроворсинок и ресничек

обеспечивают однонаправленный поток нематоцист во время выбрасывания клептокнид.

Нами была детально описана ультраструктура апикальной зоны (зона книдопора). Клеточный слой этой зоны представлен дифференцированными эпителиальными клетками, несущими длинные микроворсинки. Ультраструктура этих клеток обнаруживает значительное сходство с ультраструктурой интерстициальных клеток. Предположительно они выполняют защитную функцию при выстреливании клептокнид, предохраняя ткани кнidosака от повреждения стрекательными нитями.

Сравнение строения выстрелившего и невыстрелившего кнidosака позволяет считать, что механизм срабатывания кнidosака основан на сокращении мускулатуры, которая контролируется нервной системой. При этом за счет сокращения мышечной обкладки кнidosака происходит выдавливание клептокнид из просвета кнidosака (Рис. 3). За счет сокращения мускулатуры, подстилающей эпидермис, происходит формирование книдопора на вершине цераты, и формируется временный канал между просветом апикальной части кнidosака и внешней средой. На апикальном конце цераты базальная пластинка эпидермиса истончается, что облегчает формирование книдопора. В литературе нет единого мнения о том, как происходит высвобождение клептокнид. Ряд авторов предполагал, что в процессе выстреливания происходит частичная дезинтеграция гастродермального эпителия кнidosака, при которой клетки-книдофаги утрачивают связь с базальной пластинкой, оказываются в просвете кнidosака и затем выбрасываются через книдопор вместе с клептокнидами (Kälker & Schmekel, 1976; Greenwood & Mariskal, 1984; Martin et al., 2009). При этом книдофаги повреждаются и нематоцисты срабатывают после контакта с морской водой. По нашим данным у *A. papillosa* в выстрелившем кнidosаке нет признаков разрушения слоя книдофагов, а в воронке книдопора нет клеточного детрита, который неизбежно выдавливался бы вместе с нематоцистами, если бы книдофаги разрушались. Таким образом по нашим данным более вероятным является другой механизм высвобождения клептокнид: клептокниды выбрасываются в просвет кнidosака из книдофагов без значительных повреждений последних, далее движутся, направляемые микроворсинками и ресничками в сторону книдопора, и выдавливаются из него во внешнюю среду. Обилие вакуолей с хитиновыми веретенами в составе клеток эпидермиса апикальной части цераты имеет защитное значение. При выстреливании нематоцист хитиновые гранулы выходят из клеток и образуют своего рода барьер, защищающий клетки эпидермиса.

Разнообразие строения кнidosаков голожаберных моллюсков семейств *Aeolidiidae*, *Fionidae*, *Facelinidae*, *Myrrhinidae*.

Кнidosаки обоих изученных видов семейства *Aeolidiidae* устроены сходно. Кнidosак имеет мощную мышечную обкладку, состоящую из кольцевых и продольных мышц. В выстилке кнidosака хорошо выражены три зоны: зона пролиферации, зона книдофагов и зона книдопора. Выстилка зоны книдофагов

включает клетки-книдофаги с крупными стрекательными капсулами – мастигофорами, собранными в конические кластеры, и интерстициальные клетки. Выстилка зоны книдопора образована интерстициальными клетками с длинными микроворсинками. Большинство представителей семейства *Aeolidiidae* питается на морских анемонах. Это относится и к двум изученным видам, объектами питания которых являются актинии. Сходное строение книдосаков двух исследованных видов, вероятно, отражает адаптации к объектам и способам питания. Особенности строения книдосака представителей семейства *Aeolidiidae* так или иначе связаны с использованием специфических нематоцист актиний – крупных мастигофор. Крупные продолговатые мастигофоры образуют конические кластеры в цитоплазме книдофагов. Интерстициальные клетки несут длинные и правильно ориентированные в сторону книдопора микроворсинки. Это позволяет правильно ориентировать крупные продолговатые нематоцисты-мастигофоры в просвете книдосака в процессе выстреливания.

Строение книдосаков представителей семейств *Fionidae*, *Facelinidae*, *Myrrhinidae* характеризуется большим разнообразием. Хотя мы не обнаружили каких-либо существенных отклонений от общей схемы, некоторые морфологические особенности книдосаков различаются у разных представителей разных родов: форма, размеры книдосаков, степень развития мускулатуры, люмена, типы клептокнид, их расположение в книдофагах, количество типов клеток в зоне книдофагов и другие. Эти различия могут проявляться как у представителей разных родов, так и между видами внутри одного рода. Тип клептокнид, несомненно, зависит от вида жертвы и также может варьировать в пределах одного рода, как это имеет место внутри родов *Cuthonella* и *Eubbranchus*. В ряде случаев небольшие изменения в объектах питания (например, переход к питанию на представителях другого семейства гидроидных полипов без изменения самого механизма питания) приводит к заметным сдвигам в наборе клептокнид. Наибольшее разнообразие клептокнид было обнаружено у видов с широким спектром питания (*Hermisenda crassicornis*, *Diaphoreolis viridis*). Количество и расположение нематоцист в книдофагах может быть сходным у тех видов, которые потребляют одни и те же части добычи, например щупальца полипов (как у *Cuthonella hiemalis* и *Eubbranchus rupium*), и, наоборот, строение книдосаков и особенности организации клеток-книдофагов могут существенно различаться у видов моллюсков с одним и тем же объектом питания, но разными пищедобывательными механизмами (как это имеет место, например, у *Tergipes tergipes* и *Eubbranchus rupium*). Эти данные указывают на то, что морфология книдосаков отражает микроэволюционные изменения в механизмах и объектах питания, что может быть полезным при изучении адаптаций и экологических особенностей на видовом уровне.

Потеря способности к отбору нематоцист связана с переходом либо на не-книдарный источник пищи, либо на те виды *Cnidaria*, которые не имеют определенных типов стрекательных капсул. Так, представители рода *Calma*

питаются рыбьей икрой (Calado, Urgorri, 2002), а объектом питания *Fiona pinnata* служат усоногие ракообразные из рода *Lepas* (Willan, 1979). В то же время большинство представители родов *Phyllodesmium* и *Phestilla* перешли к питанию восьмилучевыми и склерактиниевыми кораллами соответственно. В данном случае редукция способности к клеточной защите на первый взгляд выглядит необъяснимым явлением. Тем не менее, стоит учесть, что представители этих родов питаются кораллами, содержащими только спиросисты (Schmidt, 1979). Голожаберные моллюски не секвестрируют спиросисты, поскольку этот тип стрекательных капсул бесполезен для защиты животного. Специальные исследования показывают, что моллюски рода *Phestilla* способны к отбору вторичных метаболитов из тканей добычи, которые делают их несъедобными для потенциальных хищников (Putz et al., 2010). Таким образом, у представителей рода *Phestilla* произошла смена защитной стратегии от защиты с использованием клеточной защиты к защите с использованием вторичных метаболитов (фигурально выражаясь, «вместо пуль стали использовать отравляющие газы»). Вторичное переключение на объект питания с пригодным для «пулевой» защиты набором стрекательных капсул не привело к отказу от химической защиты в соответствии с законом о необратимости эволюции.

Особенности отбора и культивирования зооксантелл у голожаберных моллюсков на примере вида *Pteraeolidia semperi*. Представители рода *Pteraeolidia* – это уникальный пример клеточной защиты и симбиоза с зооксантеллами среди голожаберных моллюсков. Большинство видов голожаберных моллюсков вообще не имеют в тканях симбиотических водорослей (Wagele, 2004; Wagele et al., 2010), в то время как у представителей родов *Melibe*, *Phyllodesmium*, *Phestilla* и других зооксантеллы используются как дополнительный источник симбиотрофного питания, в то время как основным источником пищи является потребление тканей кораллов и гидроидных полипов. Организация церат и строение пищеварительной железы *P. semperi* демонстрируют морфологические приспособления к культивированию зооксантелл и обеспечению активного фотосинтеза симбиотическими водорослями. Цераты у *Pteraeolidia semperi* располагаются пучками, на специальных базальных выростах, так, чтобы не затенять друг друга. Сами цераты уплощены, что увеличивает их поверхность. Зооксантеллы располагаются в тонких разветвлениях гастродермальных каналов, которые пересекают гемоцель и прилегают к стенке тела. Эпидермис церат *P. semperi* гораздо тоньше, чем у других голожаберных моллюсков. В экспериментальных условиях *P. semperi* способна длительное время существовать вообще без животного питания, при этом фотосинтетическая активность зооксантелл не снижается (Burghardt et al., 2008). Таким образом можно предполагать, что симбиотрофное питание за счет фотосинтетических зооксантелл имеет для *P. semperi* большее значение, чем у других голожаберных моллюсков.

Происхождение феномена клеточнидии у голожаберных моллюсков.

Главной предпосылкой для возникновения феномена клеточнидии был переход к питанию представителями типа Cnidaria. Частицы пищи поступали в отростки пищеварительной железы, где подвергаются фагоцитированию клетками гастродермиса и внутриклеточному перевариванию. Стрекательные капсулы книдарий – это очень плотные органеллы, защищенные толстой оболочкой. Такие структуры, вероятно, представляют собой трудный объект для внутриклеточного переваривания, особенно если учесть, что внутри стрекательных капсул содержатся токсические вещества. Поэтому не исключено, что трудно перевариваемые и токсичные стрекательные капсулы просто захоранивались в дистальных участках отростков пищеварительной железы, которые выполняли функцию почек накопления (Рис.6).

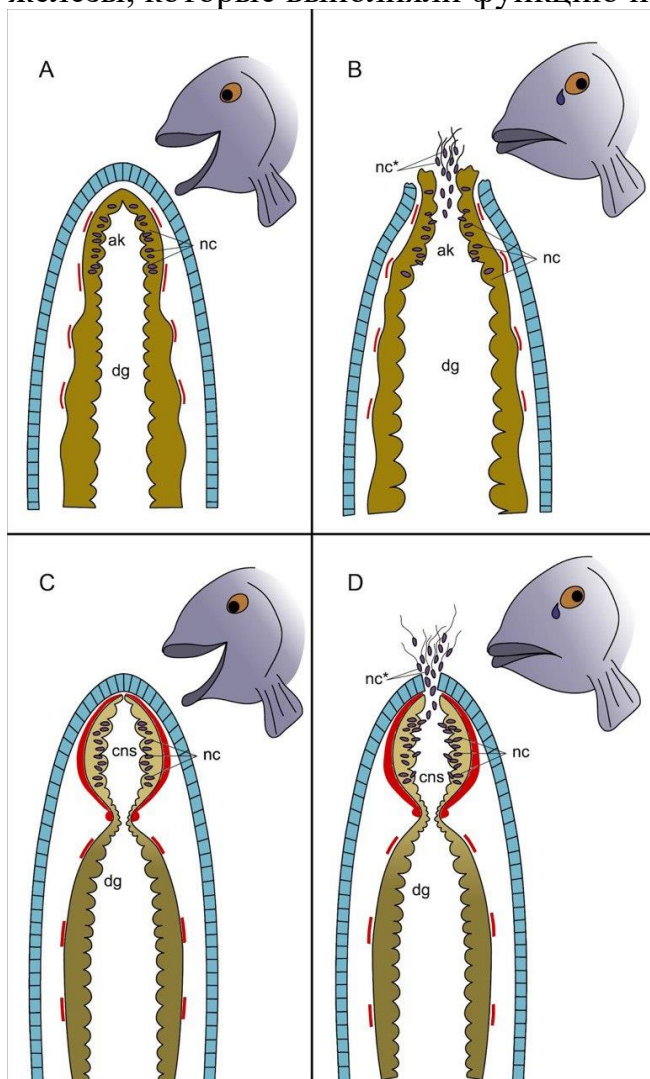


Рисунок 6. Попытка хищника откусить цераты с клеточнидами (схема).
A, C – до нападения; B, D – после нападения. ak – почка накопления; cns – кнidosак; dg – пищеварительная железа; nc – нематоциты; nc* - выстрелившие нематоциты; красным показана мышечная обкладка кишечника.

Хищники, нападавшие на голожаберных моллюсков, пытались откусить дистальные участки церат. При этом хищники освобождали стрекательные капсулы и получали ожог от их выстреливания при соприкосновении с морской водой (Рис. 6 А, В). Таким образом, моллюски накапливавшие стрекательные капсулы в самых дистальных участках пищеварительной железы на вершинах церат, получали некоторое адаптивное преимущество в смысле защиты от нападения врагов. Дальнейшая эволюция могла привести к специализации самого дистального участка пищеварительной железы, заходящей в церату, как квидосака (Рис. 6 С, D). На смену травматическому повреждению верхушки цераты, пришел регулируемый физиологический процесс, включающий согласованную работу сенсорных и моторных нервных клеток и сокращение специализированной мышечной обкладки квидосака.

Явление клептокнидии остается одним из самых необычных форм проявления взаимосвязи организмов в природных сообществах, когда один вид, являясь жертвой и пищевым объектом другого вида, защищает этот другой вид (представляющий весьма удаленный в филогенетическом отношении таксон) от его врагов. Это явление не подпадает под определение симбиоза, поскольку захваченные одним видом органеллы другого вида не являются сколько-нибудь полноценными организмами. Явление клептокнидии близко к явлению клептопластии, когда гетеротрофные организмы поедают водоросли, но не переваривают фотосинтезирующие органеллы (хлоропласты) пищевого объекта, а культивируют их в собственных клетках для обеспечения себя продуктами фотосинтеза. Клептопластия встречается среди одноклеточных организмов – днотлагеллят (Minnihagen et al., 2008), фораминифер (Bernhard, Bowser, 1999) и инфузорий (Nishitani et al., 2010), а среди многоклеточных – у ресничных червей (Van Steenkiste et al., 2019). Явление клептокнидии характерно для брюхоногих моллюсков из группы Saccoglossa, таких как *Elysia chlorotica* (Pierce et al., 2003). Заметим, что Saccoglossa входят в таксон Euthyneura, к которому принадлежат и Nudibranchia (Jörger et al., 2010). Правда, в клептопластидах имеется собственная ДНК, а в клептокнидах генетического материала нет. Заметим, что клептопластия принципиально отличается от симбиоза гетеротрофных организмов с фотосинтезирующими одноклеточными. Полученные нами данные по организации церат Pteraeolidia показывает, что настоящий симбиоз может сочетаться с явлением клептокнидии у одного и того же организма.

Полученные результаты характеризуют только один аспект этого сложного биологического явления клептокнидии. Мы попытались, используя набор современных методов исследования, выяснить, как устроен квидосак - орган, в котором содержатся клептокниды и который обеспечивает защитную реакцию, состоящую в выстреливании клептокнид из квидосака. Это позволило выяснить общие принципы организации этого органа, оценить филогенетическую значимость особенностей строения этого органа и предложить модель его функционирования как нервно-мышечного акта. Мы понимаем, как работает квидосак и понимаем, как мог возникнуть этот орган

в процессе эволюции. Эволюционный путь происхождения кнidosака, вероятно, был связан со специализацией терминального участка кишечного дивертикула и соответствующей модификацией прилежащих структур апикальной части цераты. В результате сформировался интегрированный орган, в состав которого входят компоненты, происходящих от трех зародышевых листков. Этот результат, несомненно, будет востребован как важный этап в познании биологии голожаберных моллюсков и послужит выдающимся примером изощренного эволюционного решения, поучительного и небезынского в педагогическом аспекте в преподавании зоологии и эволюционной теории.

Разумеется, мы находимся только в начале пути к познанию явления клетокнидии. Отбор клетокнид и их культивирование в цитоплазме книдофагов невозможно без сложнейших биохимических и молекулярных адаптаций. Познание этих адаптаций представляется перспективным направлением в исследовании явления клетокнидии у голожаберных моллюсков, а также в понимании этого процесса в других группах животного царства, для которого свойственно это биологическое явление. Полученные в настоящем исследовании данные по особенностям тонкой цитологической организации книдофагов и ультраструктуре других клеточных типов в составе кнidosака, несомненно, станут важной ступенькой в этих будущих исследованиях. Таким образом, завершая настоящее исследование, мы видим перспективы изучения клетокнидии не только в области функциональной и сравнительной морфологии, но и в исследовании по биохимии и молекулярной биологии процесса отбора, сохранения и использования клетокнид.

ВЫВОДЫ

1. В кнidosаке модельного вида *Aeolidia papillosa* выделено три морфологически и функционально различающиеся зоны: зона пролиферации, зона книдофагов и зона книдопора, показано наличие интерстициальных клеток, содержащих гранулы хитина, что является адаптацией к защите от выстреливания клептокнид.
2. Выстреливание кнidosака *Aeolidia papillosa* происходит через книдопор за счет сокращения мускулатуры цераты и мускулатуры кнidosака, которое, вероятно, контролируется нервной системой моллюска, при этом на вершине цераты формируется временное воронковидное отверстие, через которое во внешнюю среду выделяются клептокниды.
3. Строение кнidosаков родов семейства Aeolidiidae отражает специфику питания на актиниях, этот тип организации кнidosаков филогенетически значим и указывает на то, что он сформировался у общего предка семейства.
4. Обнаружена высокая изменчивость общей морфологии (форма, размеры, степень развития мускулатуры, люмена и др.) и гистологического строения (типу клептокнид, их расположения в книдофагах, количеству типов клеток в зоне книдофагов) кнidosаков семейства Fionidae, что отражает частные адаптации к различным объектам питания и механизмам пищедобывания и имеет низкую филогенетическую значимость.
5. Потеря способности к отбору нематоцист происходила независимо в родах *Fiona*, *Calma*, *Phestilla*. В случае родов *Fiona* и *Calma* это связано с переходом к питанию на объектах, не принадлежащих к типу Cnidaria. Лишившиеся клептокнид моллюски рода *Phestilla* продолжают питаться склерактиниевыми кораллами, но последние не содержат нематоцисты, которые используются в качестве клептокнид.
6. Организация церат и пищеварительной железы *Pteraeolidia semperi* демонстрируют морфологические адаптации к культивированию зооксантелл в разветвленных выростах пищеварительной железы и обеспечению ими активного фотосинтеза в сочетании с клептокнидами в кнidosаке.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus, Web of Science, RSCI WoS:

1. **Воробьева О. А.**, Екимова И. А., Малахов В. В. Строение кнidosаков голожаберного моллюска *Aeolidia papillosa* (Linnaeus, 1761) и возможный механизм выбрасывания клептокнид // Доклады Академии наук. – 2017 – Т. 476. – №. 6. – С. 714-718. (Vorobyeva O. A., Ekimova I. A., Malakhov V. V. The structure of cnidosacs in nudibranch mollusc *Aeolidia papillosa* (Linnaeus, 1761) and presumable mechanism of nematocysts release // Doklady Biological Sciences. – Pleiades Publishing, 2017. – Т. 476. – №. 1. – С. 196-199.) 5п.л./5п.л. **Scopus SJR 0,336**
2. **Vorobyeva O. A.**, Malakhov V. V., Ekimova I. A. General and fine structure of *Aeolidia papillosa* cnidosacs (Gastropoda: Nudibranchia) // Journal of Morphology. – 2021. – Т. 282. – №. 5. – С. 754-768. 15 п.л./15п.л. **Scopus SJR 0,629**
3. Ekimova, I. A., **Vorobyeva, O. A.**, Mikhlina, A. L., Schepetov, D. M., Vortsepneva, E. V., Antokhina, T. I., & Malakhov, V. V. Young but distinct: description of *Eubbranchus malakhovi* sp. n. a new, recently diverged nudibranch species (Gastropoda: Heterobranchia) from the Sea of Japan // Invertebrate Zoology. – 2021. – Т. 18. – №. 3. – С. 197-222. 26п.л./5п.л. **Scopus SJR 0,507**
4. Ekimova, I. A., **Vorobyeva, O. A.**, Mikhlina, A. L., Schepetov, D. M., Vortsepneva, E. V., Antokhina, T. I., & Malakhov, V. V. Nematocyst sequestration within the family Fionidae (Gastropoda: Nudibranchia) considering ecological properties and evolution // Frontiers in Zoology. – 2022. – Т. 19. – 29 27п.л./9п.л. **Scopus SJR 0,957**
5. **Воробьева О. А.**, Екимова И. А., Малахов В. В. Организация цераты голожаберного моллюска *Pteraeolidia semperi* (Gastropoda, Nudibranchia) // Доклады Академии наук. – 2023 – Т. 508. – №. 1. – С. 68-72. (Vorobyeva O. A., Ekimova I. A., Malakhov V. V. Morphological organization of cerata in a nudibranch *Pteraeolidia semperi* (Gastropoda, Nudibranchia) // Doklady Biological Sciences. – Pleiades Publishing, 2023. – Т. 508. – №. 1. – С. 74-77.) 4п.л./4п.л. **Scopus SJR 0,336**

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, академику В.В. Малахову за руководство на всех этапах работы. Автор также выражает глубокую благодарность к.б.н. И.А. Екимовой, оказавшей неоценимую помощь в освоении современных методов исследований и активное участие во всех этапах исследования. Автор выражает благодарность Т. Антохиной, Е.В. Ворцепневой, Ю. Деарту, А.Л. Михлиной, Д. Озерову, А.А. Семенову, М. Семеновой за помощь в сборе материала. Особую благодарность автор выражает директору Беломорской биостанции МГУ профессору А.Б. Цетлину за обеспечение продуктивной полевой и лабораторной работы на биостанции и коллективу Межфакультетской лаборатории электронной микроскопии МГУ за бесценную и разностороннюю помощь в проведении ультраструктурных исследований. Автор признателен к.б.н. И.А. Косевичу, к.б.н. А.А. Прудковскому, д.б.н. Е.Н. Темеревой за ценные консультации. Автор благодарен всем сотрудникам кафедры зоологии беспозвоночных МГУ за знания и навыки, полученные за годы обучения на кафедре. Автор благодарит друзей (И.А. Андвеева, Я.А. Воронину, А.П. Гайдукову, Н.П. Мельникова, Т.А. Рогатых, С.М. Тропаревскую, Д. Осипову и многих других) за моральную поддержку. Автор выражает благодарность своим родителям за заботу, помощь и терпение.