

БИОЛОГИЯ

УДК 575.16; 591.31

Т.В. Ананьина, А.А. Коханенко, А.Э. Ходжанов, В.Н. Стегний

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЯЙЦЕВЫХ ТРУБОК ЯИЧНИКОВ
CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA (Mg.) (Diptera: Calliphoridae)

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 04-04-48175), целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2006–2008)» (проект РНР.2.2.1.1.2038) и НШ – 4283.2006.4.

В ходе сравнительного анализа морфологии яйцевых трубок *D. melanogaster* и *Calliphora erythrocephala* Mg. установлено, что у *C. erythrocephala* в яйцевой трубке одновременно развиваются не более двух фолликулов. Анализ изменения морфологии хроматина трофоцитов на разных стадиях развития *C. erythrocephala* показал, что характерной особенностью оогенеза *C. erythrocephala* является рассинхронизированность клеточных циклов в трофоцитах одного фолликула, о чем свидетельствует наличие в фолликуле трофоцитов с различной морфологией хроматина. Морфогенез клеток фолликулярного эпителия *C. erythrocephala* протекает так же, как и у других насекомых, имеющих мероистические политрофные яичники.

Яйцо – высокоструктурированная система. Полярность яйца передается зиготе и играет важную роль в дальнейшем развитии эмбриона. Структура зрелого яйца устанавливается комплексом клеточных взаимодействий среди и между соматическими фолликулярными клетками и зародышевыми клетками. У двукрылых насекомых, имеющих мероистические политрофные яичники и нутриментарный тип оогенеза, детально изучен общий план строения и развития яичников. Метроистические яичники насекомых состоят из яйцевых трубок, в которых различают гермарий и вителлярый. В гермарии происходит размножение оогониев, в результате чего у дрозофилы образуется 16 цисточитов, связанных цитоплазматическими мостиками и окруженных монослоем предшественников фолликулярных клеток [1, 2]. После этого несколько предшественников фолликулярных клеток перестают делиться и дифференцируются. Эта группа формирует 2 различные популяции: 2 полярные клетки на переднем и заднем полюсах каждой яйцевой камеры. Вторая группа клеток формирует мостики между следующими друг за другом фолликулами. Эти клетки называются стalkerными (stalk cells) [3]. По мере развития вновь образовавшийся фолликул, состоящий из уже дифференцированных ооцита и нескольких питающих клеток и покрытый монослоем фолликулярных клеток, отделяется от гермария. Другие соматические клетки, покрывающие каждый фолликул (эпителиальные фолликулярные клетки), дифференцируются позже. Образовавшаяся яйцевая камера (фолликул), смещается в вителлярый – наиболее длинный отдел яйцевой трубки [4]. В вителлярый происходит рост ооцита, при этом его размеры возрастают по направлению к дистальному отделу яйцевой трубки, где происходит формирование яйца.

У представителей различных родов имеются некоторые отличия в строении яйцевых трубок. Так, у кровососущих комаров в яйцевой камере находятся 7 трофоцитов, хромосомы которых на протяжении всего развития ооцита имеют политенную структуру. В яйцевой трубке имеется гермарий с неполностью отделенным фолликулом и второй фолликул, в котором происходит формирование яйца [5]. У представителей рода *Drosophila* в яйцевых камерах находятся по

15 трофоцитов. Структура хромосом трофоцитов изменяется от политенной до ретикулярной. В яйцевой трубке образуется до 10 фолликулов [6].

Мы проанализировали развитие яйцевых трубок, изменение структуры хромосом трофоцитов и клеток фолликулярного эпителия, окружающего фолликулы, на разных стадиях оогенеза в мероистических политрофных яичниках *C. erythrocephala* (Mg.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы: *Calliphora erythrocephala* Mg. (Diptera: Calliphoridae) и *Drosophila melanogaster* Oregon R. (Diptera: Drosophilidae). Разведение имаго проводилось при стандартных условиях.

Цитологические препараты:

Яичники имаго возраста от 1 до 7 дней после выхода из пупария фиксировали в метанол-уксусном фиксаторе (3:1) в течение 2–3 дней.

Яичники имаго выделяли в этанол-уксусном (3:1) фиксаторе, затем добавляли 45%-ю уксусную кислоту и выдерживали в ней яичники 1,5–2 мин. После этого уксусную кислоту убирали при помощи фильтровальной бумаги и добавляли лактоацето-орсеиновый краситель, окрашивали 15–20 мин. Краситель удаляли фильтровальной бумагой и промывали препарата 45%-й уксусной кислотой. При помощи препаративных игл отделяли яйцевые трубки друг от друга в капле 45%-й уксусной кислоты. Накрывали препарат покровным стеклом.

Для анализа трофоцитов яичников готовили давленные и надавленные лактоацето-орсеиновые препараты. Давленные препараты использовали для анализа стадий эндомитотического цикла хромосом трофоцитов *C. erythrocephala*, а надавленные – для анализа развития фолликулов у *C. erythrocephala* и *D. melanogaster*.

Для получения препаратов яйцевых камер *C. erythrocephala*, находящихся на третьей стадии оогенеза, делали надавленные, неокрашенные препараты, покровным стеклом не накрывали.

РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Строение яйцевых трубок яичников *C. erythrocephala*

1.1. Гермарий

Гермарий *C. erythrocephala* находится в проксимальном отделе яйцевой трубки и имеет овальную вытянутую форму. На ранних стадиях формирования дистальный конец гермария заострен, на этой стадии фолликул покрывается монослоем клеток фолликулярного эпителия. Еще до отделения молодого фолликула от гермария хроматин трофоцитов политенизируется. Хроматин организован в тонкие, не имеющие четкой структуры фибриллы, которые переплетены между собой. Отдельные хромосомы не сформированы (рис. 1, а). Затем фолликул приобретает круглую форму. На этой стадии развития фолликула хроматин трофоцитов имеет первичную ретикулярную структуру (рис. 1, б).

1.2. Хроматин трофоцитов в вителлярии

После того, как молодой фолликул отделился от гермария, хроматин трофоцитов, имеющий первичную ретикулярную структуру, продолжает политенизироваться, формируются политенные хромосомы (рис. 1, в). Затем политенные хромосомы компактизу-

ются, расстояние между хроматидами увеличивается, это приводит к образованию помпоновидных хромосом (рис. 1, з). В результате дальнейшей компактизации и диссоциации хроматид (рис. 1, е) ядро заполняется субхромосомами, состоящими из сестринских хроматид и напоминающими хромосомы на стадии метафазы. Окрашивание хроматид неравномерно – видны участки более интенсивного окрашивания (рис. 1, ж). У *C. erythrocephala* в ядрах трофоцитов фолликула одновременно можно наблюдать несколько вариантов структуры хроматина (рис. 1, д). Декомпактизация метафазоподобных элементов приводит к образованию крупных ядер с ретикулярной структурой хроматина.

В фолликуле ооцит локализуется в дистальном отделе. Трофоциты занимают всю оставшуюся часть фолликула, их размер увеличивается по направлению к дистальному концу фолликула. 4 расположенных рядом с ооцитом трофоцитов имеют максимальные размеры (рис. 1, з). На этой стадии хорошо видны различия между строением ооцита и трофоцитов. Цитоплазма ооцита имеет зернистое строение, с большим количеством мелких желтковых гранул. Ядро ооцита прозрачное, занимает небольшой объем, хроматин собран в кариосферу. Трофоциты отличаются крупным ядром, занимающим почти весь объем клетки. Хроматин полиплоидизирован, имеет ретикулярную структуру и занимает весь объем ядра. Цитоплазма в виде тонкого светлого ободка окружает ядро (рис. 1, з').

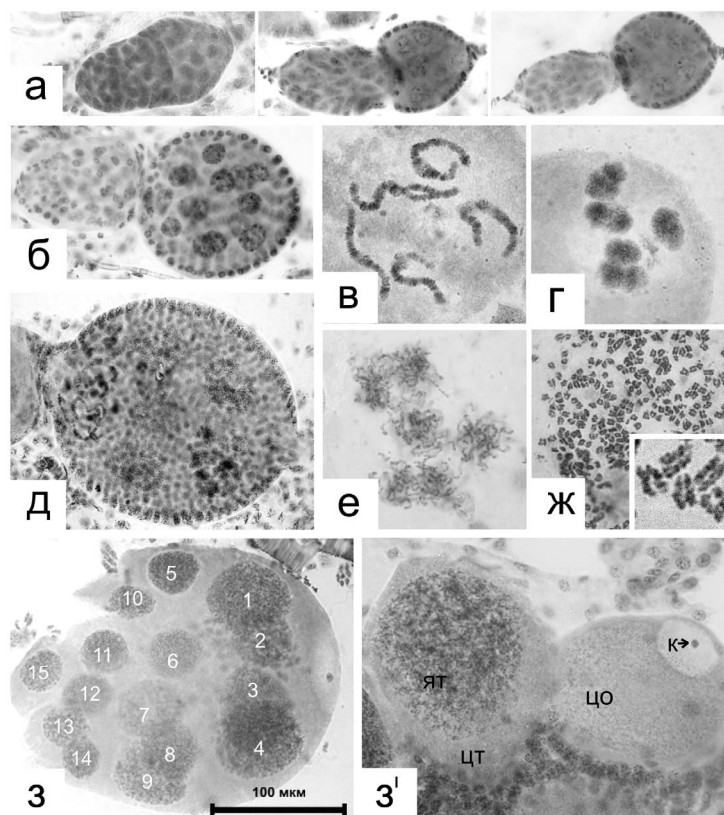


Рис. 1. Развитие фолликулов в яйцевой трубке яичника *C. erythrocephala* и изменение морфологии хроматина трофоцитов: а – отделение молодого фолликула от гермария; б – гермарий и вителлярий; в – политенные хромосомы трофоцитов; з – помпообразные хромосомы; д – различная морфология хромосом трофоцитов в фолликуле; е – начало диссоциации хромосом на сестринские хроматиды; ж – фрагмент ядра трофоцита с субхромосомами; з – ооцит и 15 трофоцитов; з' – ооцит и один из 4 соседних с ним трофоцитов. ЯТ – ядро трофоцита; ЦТ – цитоплазма трофоцита; ЦО – цитоплазма ооцита; К – кариосфера в ядре ооцита

2. Яйцевые трубки яичников *D. melanogaster* и *C. erythrocephala*

В процессе развития яичников у насекомых с нутриментарным типом оогенеза в яйцевых трубках формируются и развиваются одновременно несколько фолликулов. У *D. melanogaster* яйцевая трубка содержит гермарий и до 10 фолликулов [6]. В дистальных фолликулах происходит формирование и созревание яиц.

На рис. 2, а представлена яйцевая трубка *D. melanogaster*, состоящая из гермария и четырех фолликулов. Фолликулы по мере удаления от гермария увеличиваются в размерах и отличаются друг от друга морфологией хроматина трофоцитов. Так, в первом и во втором от гермария фолликулах формируются политенные хромосомы. В третьем фолликуле в ядрах трофоцитов имеются помпоновидные хромосомы, а в чет-

вертом (и последующих) – ядра с ретикулярной структурой хроматина.

В отличие от *D. melanogaster*, у *C. erythrocephala* в яйцевых трубках наблюдали гермарий и не больше двух фолликулов (рис. 2, б). Причем в фолликуле, следующим за гермарием, хромосомы трофоцитов последовательно проходят все стадии политенизации, затем диссоциации хроматид и образования ретикулярной структуры. Таким образом, в яйцевых трубках у *C. erythrocephala* хроматин трофоцитов первого фолликула, расположенного непосредственно за гермарием, может иметь различную морфологию – от формирующихся политенных хромосом до крупных ретикулярных ядер (рис. 1, б). Во втором фолликуле, расположенном на противоположном от гермария конце яйцевой трубки, ядра трофоцитов имеют только ретикулярную структуру, либо в нём уже произошла ризорбция трофоцитов и формируется яйцо (рис. 2, б').

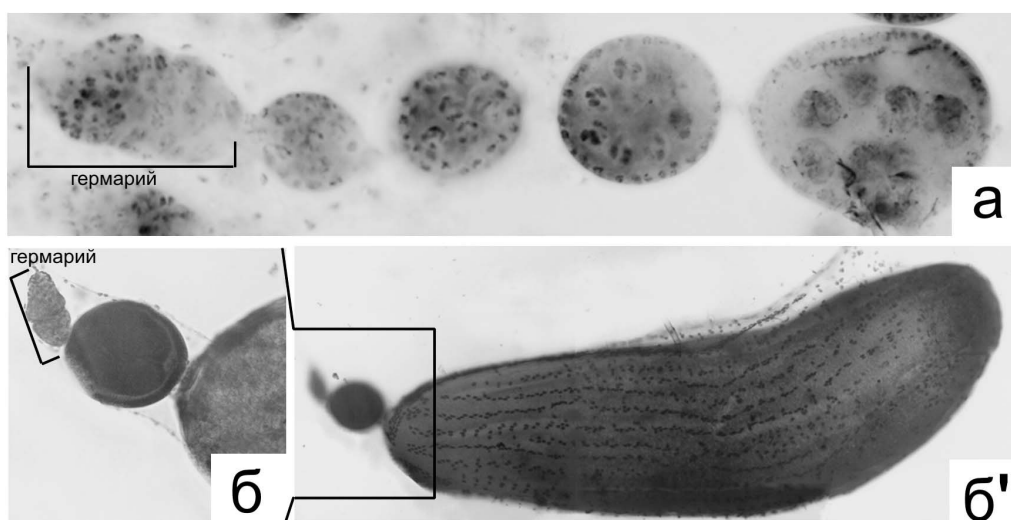


Рис. 2. Яйцевые трубки *D. melanogaster* (а) и *C. erythrocephala* (б, б')

3. Дифференцировка клеток фолликулярного эпителия яичников *C. erythrocephala*

3.1. Сталкерные клетки

У *C. erythrocephala* перетяжка из сталкерных клеток, отделяющая вновь образующийся фолликул, начинает визуализироваться в гермарии в виде поперечной, темноокрашенной полосы (рис. 3, а). На этой стадии гермарий приобретает гантелевидную форму. Постепенно молодой фолликул отделяется от гермария, оставаясь связанным с ним коротким, широким мостиком (рис. 3, б). Сталкерные клетки на этой стадии уплотненные, располагаются плотно друг к другу. В дальнейшем эти клетки приобретают неправильную, удлиненную форму и в виде тяжа, состоящего из цепочки клеток, соединяют растущие фолликулы (рис. 3, в).

3.2. Клетки фолликулярного эпителия, контактирующие с трофоцитами и ооцитом

Был проведен анализ фолликулов яичников *C. erythrocephala*, находящихся на 4-й стадии оогенеза (Bier,

1963), когда яйцеклетка больше четырех питающих клеток и занимает около половины фолликула, принимающего овальную форму. На этой стадии хроматин трофоцитов имеет ретикулярную структуру. Клетки фолликулярного эпителия покрывают монослоем весь фолликул (рис. 3, з). Слой фолликулярных клеток, покрывающий ооцит, имеет утолщение, которое состоит из нескольких клеток. Кластер этих клеток находится на заднем полюсе фолликула, в области, где в дальнейшем будет развиваться головная часть эмбриона. Вероятно, в этот кластер входят задние полярные клетки и несколько прилегающих к ним клеток (рис. 3, д).

Были изучены две популяции клеток фолликулярного эпителия у *C. erythrocephala*. Для этого было произведено отделение клеток фолликулярного эпителия покрывающих ооцит (вместе с ооцитом) от остальной части фолликула, содержащей трофоциты и контактирующие с ними фолликулярные клетки. Анализ препаратов этих групп клеток показал, что клетки, покрывающие трофоциты и ооцит, отличаются по форме и положению ядра.

Клетки фолликулярного эпителия, покрывающие трофоциты, на препаратах располагаются группами.

Они имеют неправильную форму, ядра располагаются в центре клетки (рис. 3, *e*).

Клетки, покрывающие ооцит, на препаратах располагаются в виде цепочек и имеют вытянутую, прямоугольную форму. Ядра в этих клетках смещены к апикальной мембране, отделяющей ооцит от клеток фол-

ликулярного эпителия, что характерно и для *D. melanogaster* [7]. Хорошо виден градиент в окрашивании цитоплазмы: ближе к базальной мембране цитоплазма окрашивается интенсивнее (рис. 3, *ж*). В обоих типах клеток интенсивно прокрашивается хроматин, причем хорошо видно, что хроматин политенизирован.

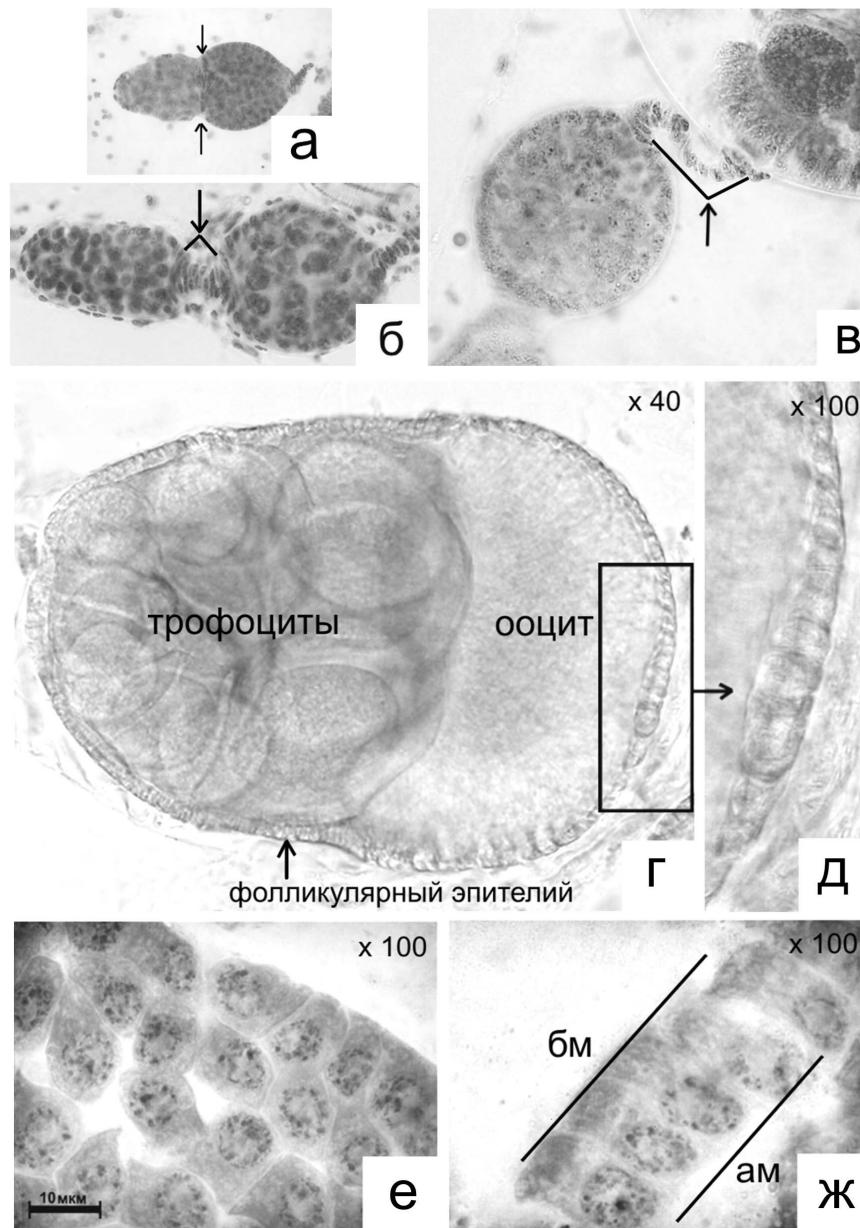


Рис. 3. Фолликулярные клетки яичника *C. erythrocephala*: *a* – начало отделения фолликула от гермария; *б* – фолликул связан с гермарием мостиком из стalkerных клеток; *в* – мостик из стalkerных клеток, соединяющих два фолликула (стрелками указаны стalkerные клетки, изменяющиеся по мере роста фолликула); *г* – фолликул с развивающимся ооцитом; *д* – группа фолликулярных клеток на переднем полюсе фолликула; *е* – клетки фолликулярного эпителия, покрывающие трофоциты; *ж* – клетки фолликулярного эпителия, покрывающие ооцит (бм – базальная мембрана, ам – апикальная мембрана, контактирующая с ооцитом)

ОБСУЖДЕНИЕ

Общий план строения и развития яйцевых трубок у *C. erythrocephala* такой, как и у других представителей Diptera, имеющих мeroистические политрофные яичники. Протекание эндоциклов в трофоцитах Diptera в общем сходно, но отличается на заключительных этапах, где происходят такие процессы, как компактиза-

ция хромосом и их распад на отдельные хроматиды. В отличие от дрозофилы, у которой компактизация политенных и формирование помпоновидных хромосом происходит в конце S-фазы 4-го эндоцикла при переходе от 32 С к 64 С [8], у *C. erythrocephala* стадия формирования помпоновидных хромосом (рис. 1, *в*) происходит при переходе от 16 С к 32 С [9, 10]. Следующий затем хромосомный распад происходит у *D. mela-*

nogaster очень быстро, точно в момент перехода из S5 в G6-фазу. Это указывает на строгую корреляцию морфологических преобразований хроматина с клеточным циклом [8]. У *C. erythrocephala* распад протекает, вероятно, в конце S-фазы 4-го эндочикла. Характерной особенностью этой стадии является чёткая морфология субхромосом, состоящих из сестринских хроматид. Таким образом, в фолликуле *C. erythrocephala* трофоциты с различной морфологией хроматина находятся на разных стадиях эндометафазного цикла и имеют разную степень плоидности, что свидетельствует о рассинхронизированности клеточных циклов в трофоцитах одного фолликула [11, 12].

Различия в количестве образующихся фолликулов в яйцевых трубках у насекомых может быть напрямую связано с механизмами индукции передне-задней полярности в формирующейся цисте и, в первую очередь, дифференцировки ооцита. У дрозофилы ооцитом становится клетка, контактирующая с фолликулярным эпителием, содержащая центриоли, мигрирующие из других цисточитов [13]. В ооците сосредоточены минус концы микротрубочек. Ооцит отличается от других клеток цисты также наличием материала фузома (структуры, объединяющей цистобласты через кольцевые каналы), BicD белка и других цитоплазматических маркеров [14, 15]. Различия в морфологии ооцита и трофоцитов обусловлены их функционированием: в ядре ооцита *C. erythrocephala*, как и у большинства насекомых, в течение оогенеза отсутствует ядрышко, а хромосомы формируют кариосферу – показатель того, что функцию синтеза рРНК берут на себя трофоциты. Так, содержание рибосомной РНК в развивающемся яичнике каллифоры на 35% выше, чем в диплоидной ткани мозга [16]. Политенизация хромосом трофоцитов объясняется той функциональной нагрузкой, которую эти клетки несут в процессе оогенеза – ооциту необходимо расти до огромного размера и накапливать большие количества необходимых для эмбриогенеза веществ [17].

Главную роль в процессе формирования фолликулов играют клетки фолликулярного эпителия: полярные и сталкерные. Когда молодая циста позиционировала свой ооцит, активизируется передача молекулярных сигналов к клеткам фолликулярного эпителия следующей за ней цисты. Таким образом, у дрозофилы более старший фолликул на определенном этапе своего развития индуцирует формирование нового фолликула через «релейный» механизм передачи поляризующих сигналов [18]. У малярийных комаров толчком к разви-

тию очередного фолликула служит кровососание, а при отсутствии питания фолликулы дегенерируют [5]. Молекулярные механизмы такой индукции, а также механизмы формирования новых фолликулов в яичниках круглошовных мух, к которым относится *C. erythrocephala*, пока не выяснены.

Вероятно, существует зависимость между количеством образующихся фолликулов в яйцевой трубке и такими важными физиологическими характеристиками видов, как количество кладок и время, проходящее между двумя кладками.

Дифференцировка клеток фолликулярного эпителия, играющего основную роль в формировании передне-задней полярности ооцита, начинается на самых ранних этапах оогенеза при формировании новых фолликулов [19]. Визуально самой первой начинает выделяться группа клеток, образующая мостики между фолликулами – сталкерные клетки. Кроме механической функции – связывания фолликулов между собой – сталкерные клетки играют очень важную роль в позиционировании ооцита во вновь образующейся цисте [18]. А мутации в сталкерных клетках, нарушающие дифференцировку и развитие этих клеток, приводят к дефектам в формировании яйца [20]. У *D. melanogaster* морфологические отличия между клетками, покрывающими фолликул, начинают проявляться, начиная с седьмой стадии оогенеза. Эти отличия заключаются в изменении толщины и формы клеток. На более поздних стадиях у дрозофилы уже 95% клеток эпителия, примыкающие к ооциту, становятся значительно толще и имеют столбчатую форму (столбчатые клетки), а клетки, примыкающие к трофоцитам, имеют плоскую форму (чешуйчатые клетки) [7]. У *C. erythrocephala* при образовании фолликула и во время его роста в течение стадии 1 оогенеза (которая соответствует стадии 6 у *D. melanogaster* [21]) клетки фолликулярного эпителия активно делятся и морфологически не отличаются друг от друга. Морфогенез сталкерных клеток протекает так же, как и у *D. melanogaster*. При дальнейшем росте фолликула начинают проявляться отличия в форме между группами клеток, контактирующих с ооцитом и трофоцитами. Как и у *D. melanogaster* [21], хромосомы клеток фолликулярного эпителия политенизированы. Таким образом, морфогенез клеток фолликулярного эпителия у *C. erythrocephala* визуально не отличается от изменений клеток фолликулярного эпителия в яйцевых трубках *D. melanogaster*, и, вероятно, других насекомых с мероистическими политрофными яичниками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Koch E.A., Smiht P.A., King R.S. The division and differentiation of *Drosophila* cystocytes // *J. Morphol.* 1967. Vol. 121. P. 55–70.
2. Bier K. Autoradiographische Untersuchungen über die Leistungen des Follikelepithels und der Nährzellen bei der Dotterbildung und Eiweissynthese im Fliegenovar // *Wilhelm Roux's Arch. Entwickl. Mech.* 1963. Bd. 154, № 6. S. 552–575.
3. Buskirk C.V., Schubach T. Versatility in signalling: multiple responses to EGF receptor activation during *Drosophila* oogenesis // *Cell Biology.* 1999. Vol. 9. P. 1–4.
4. Айзенштадт Т.Б. Цитология оогенеза. М.: Наука, 1984. 247 с.
5. Горностаева Р.М., Данилов А.В. Комары Москвы и Московской области. М., 1999. 341 с.
6. Keyes L.N., Spradling A.C. The *Drosophila* gene *fs(2)cup* interacts with *otu* to define a cytoplasmic pathway required for the structure and function of germ-line chromosomes // *Development.* 1997. Vol. 124, № 7. P. 1419–1431.
7. Frydman H.M., Spradling A.C. The receptor-like tyrosine phosphatase *Lar* is required for epithelial planar polarity and for axis determination within *Drosophila* ovarian follicles // *Development.* 2001. Vol. 128. P. 3209–3220.
8. Dej K.J., Spradling A.C. The endocycle controls nurse cell polytene chromosome structure during *Drosophila* oogenesis // *Development.* 1999. Vol. 126 (2). P. 293–303.

9. Bier K. Beziehungen zwischen Wachstumsgeschwindigkeit, endometophasischer Kontraktion und der Bildung von Riesenchromosomen in den Nährzellen von *Calliphora erythrocephala* // Z. Naturforsch. 1958. Bd. 13b. S. 80–93.
10. Bier K. Der Karyotyp von *Calliphora erythrocephala* Meigen unter besonderer Berücksichtigung der Nährzellenkernchromosomen im debündelten und gepaarten Zustand // Chromosoma. 1960. Vol. 11. P. 335–364.
11. Стегний В.Н., Вассерлауф И.Э., Ананьина Т.В. Идентификация, взаиморасположение и развитие первичных политенных хромосом в ядрах трофоцитов у *Calliphora erythrocephala* (Diptera: Calliphoridae) // Генетика. 1999. Т. 35, № 7. С. 912–918.
12. Ананьина Т.В., Ведерников А.Е., Вассерлауф И.Э., Карамышева Т.В. и др. Визуализация хромосомных территорий в интерфазных ядрах трофоцитов яичников *Calliphora erythrocephala* (Mg.) (Diptera: Calliphoridae) // Генетика. 2005. Т. 41, № 10. С. 1106–1112.
13. Mahowald A.P., Strassheim J.M. Intercellular migration of centrioles in the germarium of *Drosophila melanogaster* // J. Cell Biol. 1970. Vol. 45, № 2. P. 306–320.
14. Cuevas M., Lilly M.A., Spradling A.C. Germline cyst formation in *Drosophila* // Annu Rev Genet. 1997. № 31. P. 405–428.
15. Riechmann V., Ephrussi A. Axis formation during *Drosophila* oogenesis // Genetics & Development. 2001. № 11. P. 374–383.
16. Renkawitz R., Kunz W. Independent replication of the ribosomal RNA genes in the polytrophic meristotic ovaries of *Calliphora erythrocephala*, *Drosophila hydei* and *Sarcophaga barbata* // Chromosoma. Berlin, 1975. Bd. 53. S. 131–140.
17. Хвостова В.В. Эндомитоз в питающих клетках насекомых в связи с ролью материнского генотипа в организации яйца // Проблемы генетики в исследованиях В.В. Хвостовой. Н.: Наука, 1980. С. 23–36.
18. Torres I.L., Lopez-Schier H., Johnston D.St. A Notch/Delta-Dependent Relay Mechanism Establishes Anterior-Posterior Polarity in *Drosophila* // Developmental Cell. 2003. Vol. 5. P. 547–558.
19. Grammont M., Irvine K.D. Organizer activity of the polar cells during *Drosophila* oogenesis // Development. 2002. Vol. 129. P. 5131–5140.
20. Tworoger M., Keller Larkin M., Bryant Z., Ruohola-Baker H. Mosaic Analysis in the *Drosophila* Ovary Reveals a Common Hedgehog-Inducible Precursor Stage for Stalk and Polar Cells // Genetics. 1999. Vol. 151. P. 739–748.
21. Shcherbata H.R., Althausen C., Findley S.D., Ruohola-Baker H. The mitotic-to-endocycle switch in *Drosophila* follicle cells is executed by Notch-dependent regulation of G1/S, G2/M and M/G1 cell-cycle transitions // Development. 2004. Vol. 131. P. 3169–3181.

Статья представлена научно-редакционным советом журнала, поступила в научную редакцию «Биологические науки» 20 июля 2006 г., принята к печати 25 ноября 2006 г.