

УДК 591

**МОРФОДИНАМИКА ПЛАСТИНКИ КОНТАКТА В ХОДЕ СОЗРЕВАНИЯ
ООЦИТА У СЦИФОИДНОЙ МЕДУЗЫ *Aurelia aurita*
(Cnidaria: Semaestomae)**

© 2012 г. Л. С. Адонин^{1,2}, О. И. Подгорная^{1,2}, Т. Г. Шапошникова¹

¹ Кафедра цитологии и гистологии Санкт-Петербургского государственного университета

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

E-mail: leo.adonin@gmail.com

Поступила в редакцию 09.04.2009 г.

Окончательный вариант получен 08.04.2011 г.

Структура, формирующаяся в области контакта ооцита с зачатковым эпителием при созревании ооцита сцифомедузы *Aurelia aurita*, названа пластинкой контакта. В представленной работе на светоптическом и ультраструктурном уровне прослежены последовательные этапы формирования пластинки контакта в процессе созревания ооцита. На начальных стадиях развития ооцита в его периферической цитоплазме отмечено появление гранул, которые скапливаются на полюсе, сохраняющем связь с зачатковым эпителием гонад. Среди этих гранул выявлены два типа – с гомогенным содержимым и рыхлым неоформленным материалом в виде толстых тяжей. Преобразование гранул 2 типа в более крупные структуры, а также объединение гранул 1 и 2 типов на поздних этапах развития ооцита, вероятно, и приводит к образованию видимой на парафиновых и полутонких срезах характерной структуры – пластинки контакта. Остается неясной точная локализация пластинки контакта в момент оплодотворения – внутри ооцита или вне его. Содержимое гранул и компоненты пластинки специфически связывают антитела (RA47) против мезоглеина, ZP-домен-содержащего белка мезоглея *A. aurita*. Пластинка контакта, покрывающая только анимальный полюс ооцита, но обнаруженная по наличию ZP-доменных белков, может оказаться простейшей среди яйцевых оболочек типа Zona Pellucida.

Ключевые слова: *Aurelia aurita*, внеклеточный матрикс, мезоглеин, ZP-домен-содержащие белки.

Принятые сокращения: ZP – zona pellucida; BSA – бычий сывороточный альбумин, BCIP – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, NBT – nitro blue tetrazolium, PVDF – polyvinylidene difluoride, GAR-AP – антитела против IgG кролика, полученные в козе и конъюгированные со щелочной фосфатазой, GAR-FITC – антитела против IgG кролика, полученные в козе, конъюгированы с Fluorescein isothiocyanate, GAR-Rhodamin – антитела против IgG кролика, полученные в козе, конъюгированы с Rhodamin, EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid, PBS – фосфатно-солевой буфер, PMSF – phenyl methyl sulfonyl fluoride.

ВВЕДЕНИЕ

Представители типа Кишечнополостные (Coelenterata или Cnidaria) – низшие многоклеточные животные, тело которых образовано двумя эпителиальными слоями (эпи- и гастродермой), между которыми расположена прослойка мезоглея (Chapman D., 1974; Harrison, Westfall, 1991). Степень развития мезоглея варьирует не только у представителей разных классов, но и на разных стадиях жизненного цикла. Мезоглея определяет форму тела животного. Она участвует в транспорте

и накоплении питательных веществ (Bouillon, Corrois, 1977; Weber, Schmid, 1985). Мезоглея сцифоидной медузы вида *Aurelia aurita* (класс Scyphozoa, отр. Semaestomae, сем. Ulmaridae) и многих других представителей классов Scyphozoa и Anthozoa заселена свободными подвижными клетками – мезоглеальными клетками (Chapman G., 1966). Наличие мезоглеальных клеток в мезоглее не универсально. У тех видов, у которых встречаются амёбодные мезоглеальные клетки, мезоглея приобретает гистологическое сходство с соединительными тканями высших животных (Заварзин, 1945; Chapman D., 1974).

Среди полипептидов мезоглея зрелых медуз *A. aurita*, определенных с помощью денатурирующего электрофореза по Лэммли, определяется несколько мажорных белков. Одним из них является белок с молекулярной массой 47 кДа – мезоглеин (Matveev et al., 2007). При помощи антител (RA47), полученных к мезоглеину, удалось определить его локализацию – в специфических гранулах мезоглеальных клеток и в составе “эластических” волокон межклеточного матрикса мезоглея зрелых медуз (Shaposhnikova et al., 2005). Вероятно, что мезоглеин синтезируется в виде белка-предшественника в мезоглеальных клетках, а затем подвергается

посттрансляционным модификациям и выводится в матрикс мезоглеи.

В составе мезоглеина выявлено два функциональных домена: ZP (Zona Pellucida) и DSL (Delta/Serrate/Lag-2). Наличие первого из них дало основание отнести белок к обширному суперсемейству ZP-домен-содержащих белков. В суперсемейство входят в основном внеклеточные белки. У представителей разных ветвей эволюционного древа в 2005 году описано около 700 белков, содержащих этот домен (Jovine et al., 2005), сейчас их количество приближается к 1000. Свое название семейство получило потому, что первыми описанными белками стали три гликопротеина Zona Pellucida плацентарных млекопитающих, отличительной особенностью которых был цистеин-богатый домен, локализованный на С-конце полипептида – ZP-домен (Wassarman et al., 1999).

ZP-домен-содержащие белки обнаружены как у высших многоклеточных (ZP1-3, α - и β -текторин, рецептор TGF- β и многие другие), так и у представителей более низших в эволюционном плане животных (VERL у моллюска *H. rufescens*, белки дрозофилы NompA, Cuticlin-1 и др.) (Tarin and Cano, 2000). ZP-доменные белки характеризуются мозаичным строением, между сигнальным N-пептидом и ZP-доменом в их состав входят разные и в разных комбинациях структурно-функциональные домены (Jovine, 2005). При всем разнообразии биологических функций представителей семейства, в основном они являются структурными компонентами, и/или выполняют рецепторную функцию.

Большая часть описанных ZP-домен-содержащих белков вовлечена в процессы оплодотворения как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных (Tarin, Cano, 2000; Wassarman, 2009). Подобные белки у низших беспозвоночных животных (кишечнополостные, гребневики, губки) до работ нашей группы описаны не были. Мезоглеин оказался представителем семейства ZP-белков, поэтому мы предположили, что если ген мезоглеина является эволюционным приобретением *A. aurita*, то его ZP-домен может быть вовлечен и в процесс оплодотворения.

В аминокислотной последовательности мезоглеина ZP-домен занимает более половины всего белка (Matveev et al., 2007). Вероятно, что антитела поликлональной сыворотки RA47 распознают именно ZP-домен мезоглеина. На парафиновых срезах тканей гонад половозрелых самок *A. aurita* антитела выявляют материал в области контакта ооцитов с зачатковым эпителием. Для удобства описания структуре присвоено название пластинки контакта (Адонин и др., 2009). Морфология и динамика образования пластинки контакта нуждаются в описании, чему и посвящена настоящая работа.

Изучение формирования пластинки контакта затруднено тем, что оогенез у представителей класса Scyphozoa описан неполно. Первые работы по микроанатомическому строению тканей медуз относятся еще к 19–началу 20 вв.: Особенности строения гонад у разных видов сцифоидных медуз использовали для построения филогенетического древа (Haeckel, 1881; Claus, 1883; Maas, 1897; Vanhöffen, 1902 – цит. по Morandini et al., 2001). Известно, что ооциты сцифоидных медуз возникают из зачаткового эпителия, который выстилает стенки полового синуса (рис. 1), являющегося производным гастродермы (Иванова-Казас, 1975; Eckelbarger, Larson, 1988, 1992).

Мы выделили семь (I–VII) последовательных стадий в развитии ооцита, основываясь на работе Экельбаргера и Ларсона (1988) и собственных наблюдениях (Адонин и др., 2009). Основной критерий выделения стадий – диаметр ооцита (от 10 мкм на I стадии, до 170 мкм на последнем этапе созревания) и наличие специфических гранул (рис. 1). В настоящей работе мы исследовали морфологические особенности образования пластинки контакта в ходе формирования ооцита у сцифомедузы *A. aurita*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Сбор материала. Объект исследования – половозрелые самки *Aurelia aurita* (класс Scyphozoa, отр. Semaestomae, сем. Ulmaridae) с диаметром зонтика 15 см и более. *A. aurita* – вид-космополит, но материал настоящей работы собран в популяции, обитающей в Чупинской губе Белого моря. Медуз собирали сачком с весельной лодки в окрестностях Беломорской биологической станции Картеш Зоологического института РАН.

Животных препарировали, отделяя гонады с помощью пинцета и скальпеля от эпидермы и гастродермы. Кусочки ткани для молекулярных исследований замораживались (-20°C) и дальнейшее исследование производилось в условиях стационарной лаборатории Биолого-почвенного факультета СПбГУ. Часть материала фиксировали для световой и электронной микроскопии (см. разделы Иммунофлюоресценция, Полутонкие срезы и Ультратонкие срезы).

Полутонкие срезы. Кусочки гонад самок *A. aurita* с прилегающей мезоглеей фиксировали в 2% растворе глутаральдегида на какодилатном буфере и дофиксировали в 1% растворе OsO_4 . Фиксированный материал заливали в эпон по методике, предложенной производителем (Sigma, USA). Срезы толщиной 0.5 мкм изготавливали на ультратоме Leica EM UK6. Полученные срезы окрашивали 0.1% раствором кислого фуксина на 30% этаноле в течение 1–2 мин при постоянном подогреве (до 60°C), после чего краску смывали проточной ди-

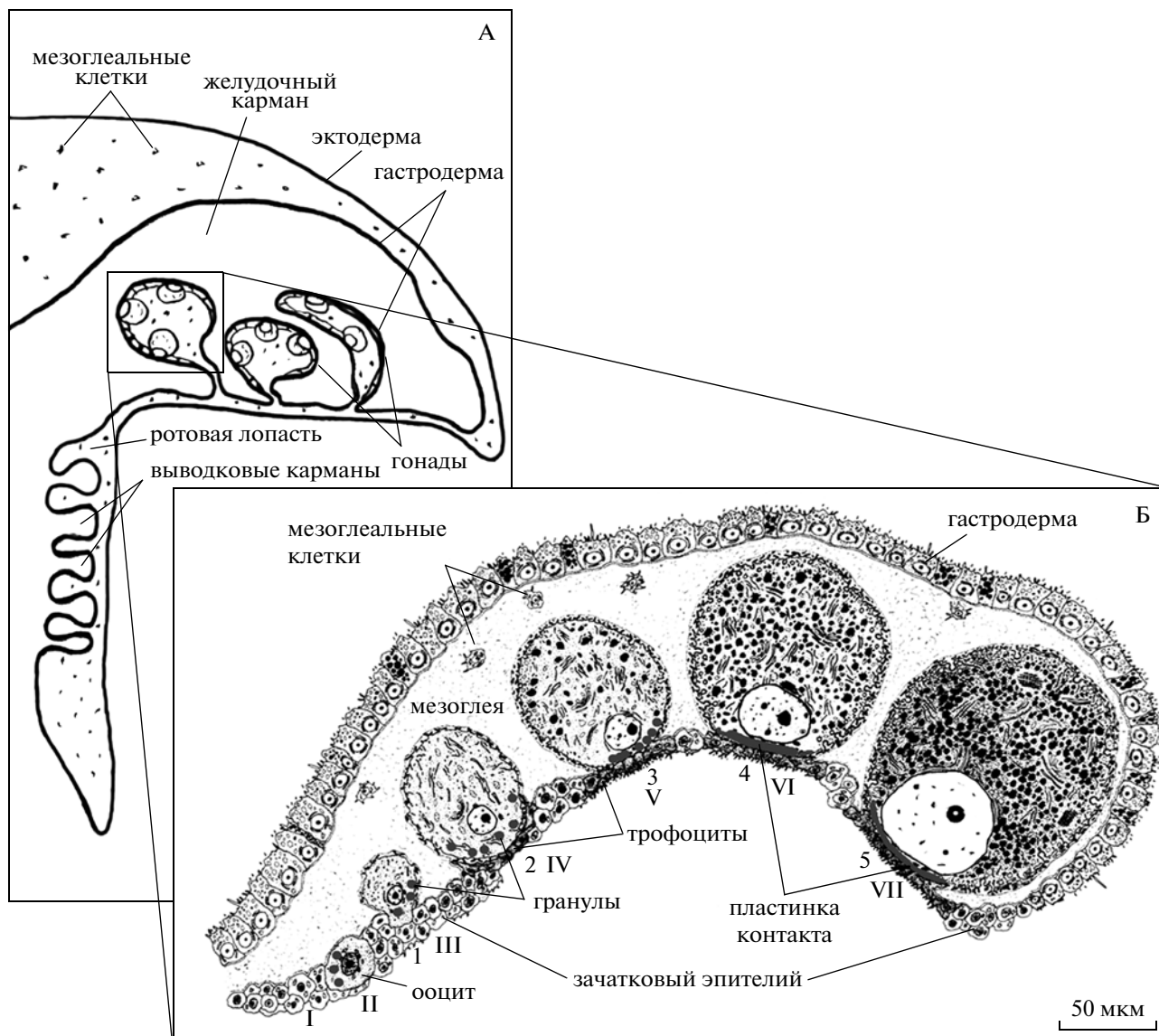


Рис. 1. Стадии развитие ооцита сцифоидной медузы *Aurelia aurita*. А – общая схема расположения гонады, продольный срез через тело медузы. Б – схема гонады (из Экельбаргера и Ларсона (Eckelbarger, Larson, 1988), с изменениями). 1–5 – стадии развития ооцита по Экельбаргеру и Ларсону; I–VII – стадии развития ооцита по Адонину и др. (2009).

стиллированной водой. Наблюдение и фотосъемку проводили на микроскопе Leica DM 6000B.

Ультратонкие срезы. Материал для приготовления ультратонких срезов фиксировали так же, как описано в разделе “Полутонкие срезы”. Заливка в эпоновые блоки производилась согласно методике производителя (Sigma, USA). Приготовление ультратонких срезов (65–70 нм толщиной) осуществлялось на ультратоме Leica EM UK6.

После переноса срезов на поддерживающие сеточки (West Chester, PA, USA), срезы контрастировали по следующей методике: насыщенный раствор уранилацетата (20–25 мин), после которого следовала отмывка под струей дистиллированной воды, 0.02 М NaOH (в течение 10 минут), раствор

цитрата свинца (25 мин при +4°C в темноте) после чего вновь раствор смывали под струей дистиллированной воды. Срезы высушивали. Наблюдение проводили на микроскопах: Libra 120, Leo 910 OMEGA.

Иммунофлуоресценция. Кусочки гонады с прилегающей мезоглеей фиксировали в растворе 4% параформальдегида на 0.1 М фосфатном буфере, тоничность подводили сахарозой и NaCl. Материал хранили в 70%-ом этаноле. Зафиксированный материал заливали в парафиновые блоки. Изготавливали серийные срезы толщиной 3–5 мкм при помощи санного микротомы Leica SM 2000 R. Перед окрашиванием срезы обеспарафинивали, переводя в водную среду по классической методике

(Пирс, 1962). После депарафинирования срезы споласкивали в дистиллированной воде и двух сменах TBS-Tween. Выявление антигенов производили по стандартной методике (Кэтти и др., 1991), инкубируя срезы с антителами RA47 в конечном разведении 1 : 4000. Получение и определение специфичности антител RA47 описано ранее (Shaposhnikova et al., 2005). Использовали вторые антитела, конъюгированные с FITC или Rhodamin (GAR-FITC, GAR-Rhodamin, Sigma). Все операции проводили при комнатной температуре (20°C). Окрашенные срезы заключали в глицерин и наблюдали под микроскопом Leica DM 6000B. В контроле вместо 1-х антител срезы инкубировали в растворе PBS-Tween, содержащем 5% лиофилизированного обезжиренного молока и 1.5% бычьего сывороточного альбумина.

Использованные реактивы и материалы: BSA, BCIP, NBT, Coomassie G-250, Epon, SDS, PVDF, GAR-AP, Tween, PMSF, EDTA (все – Sigma, USA); глицин, NaCl, сахараза (все – ICN, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ

На ультраструктурном уровне отмечаются следующие особенности организации ооцита *A. aurita*: на начальных стадиях развития (I стадия, диаметр клетки 10 мкм) в центре клетки находится крупное прозрачное ядро, в котором выявляется одиночное плотное фибриллярное образование, определяемое нами как ядрышко. Хроматин диспергирован и равномерно распределяется по всему объему ядра. Вокруг ядра в периферической цитоплазме располагается большое количество митохондрий. Здесь же, в цитоплазме, отмечается появление немногочисленных гранул (рис. 2А, 2Б, I). Это округлые окруженные мембраной цитоплазматические пузырьки размером от 1.5 до 3 мкм.

На основании ультраструктурного анализа мы подразделяем эти гранулы на 2 типа. Гранулы 1 типа – округлые мембранные пузырьки диаметром от 1.5 до 3 мкм, заполненные электронно-плотным гомогенным содержимым. Гранулы 2 типа представляют собой сферические образования (диаметр 2–3 мкм), окруженные мембраной, внутри которых находится рыхлый неоформленный материал, формирующий толстые переплетающиеся тяжи (рис. 2Б). Численное соотношение гранул на I–II стадиях развития ооцита примерно одинаково.

Начиная с III стадии по мере увеличения объема ооцита происходит его выталкивание в прилежащую к зачатковому эпителию мезоглею, связь ооцита с герминативным эпителием сохраняется только на анимальном полюсе (рис. 2А, IV, V, VII). Клетки последнего, контактирующие с ооцитом, начинают уплощаться, а к финальным этапам формирования ооцита эпителий в этой области представлен слоем сильно уплощенных клеток

(рис. 2А, 2Б). В области контакта ооцита с зачатковым эпителием отмечается скопление цитоплазматических гранул обоих типов: гомогенные гранулы 1 типа и заполненные тяжами гранулы 2 типа. При этом в остальной цитоплазме данные гранулы отсутствуют. Ядро заполнено тонким фибриллярным содержимым, какие-либо ядерные структуры нами не были выявлены.

На IV стадии развития по мере роста ооцита (диаметр 30–40 мкм) объем ядра продолжает увеличиваться, оно еще больше смещается к анимальному полюсу. Здесь же выявляются гранулы 2-х типов, при этом общее количество гранул, декорирующих данную зону ядра, увеличивается, а их численное соотношение смещается в сторону гранул 1 типа (рис. 2Б, IV).

Диаметр ооцита к VII стадии увеличивается до 150–170 мкм, соответственно, диаметр ядра достигает 70 мкм (рис. 2А, VII). В центре ядра присутствует плотная фибриллярная структура, по нашему мнению являющаяся ядрышком. Ядро находится в непосредственной близости к анимальному полюсу клетки и заполнено электронно прозрачным содержимым. Количество специфических гранул, расположенных на анимальном полюсе ооцита, значительно увеличивается на завершающих стадиях роста, они заполняют практически все узкое пространство между ядром и цитоплазматической мембраной. При этом отмечается численное преобладание гранул 2 типа (рис. 2Б, VII) по сравнению с гранулами 1 типа. На последней стадии нами была прослежена динамика преобразования гранул 2 типа в более крупные структуры, достигающие в диаметре 5–8 мкм. Также было выявлено, что в этот период происходит слияние гранул 1 и 2 типов. А в некоторых участках цитоплазмы можно было наблюдать подготовку гранул к экзоцитозу (рис. 2Б, VII, стрелки).

Непрямое иммунофлуоресцентное окрашивание парафиновых срезов гонады *A. aurita* антителами RA47 показало, что в зоне контакта ооцита с зачатковым эпителием с антителами специфически взаимодействует материал тех гранул, которые заполняют пространство между ядром и плазматической мембраной ооцита и формируют в итоге пластинку контакта (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Блестящая оболочка (Zona Pellucida), окружающая ооцит высших позвоночных (мыши, коровы, кролика) состоит из 3 гликопротеинов содержащих ZP-домен (Wassarman et al., 2001). Ооцит членика экспрессирует 4 ZP-доменных гликопротеина (ZPA, ZPB1, ZPB2 и ZPC), которые обнаруживаются в блестящей оболочке (Tarin, Cano, 2000). К настоящему моменту описано большое количество аналогов Zona Pellucida и у других животных: хорион костистых рыб, *перивителлиновый слой*

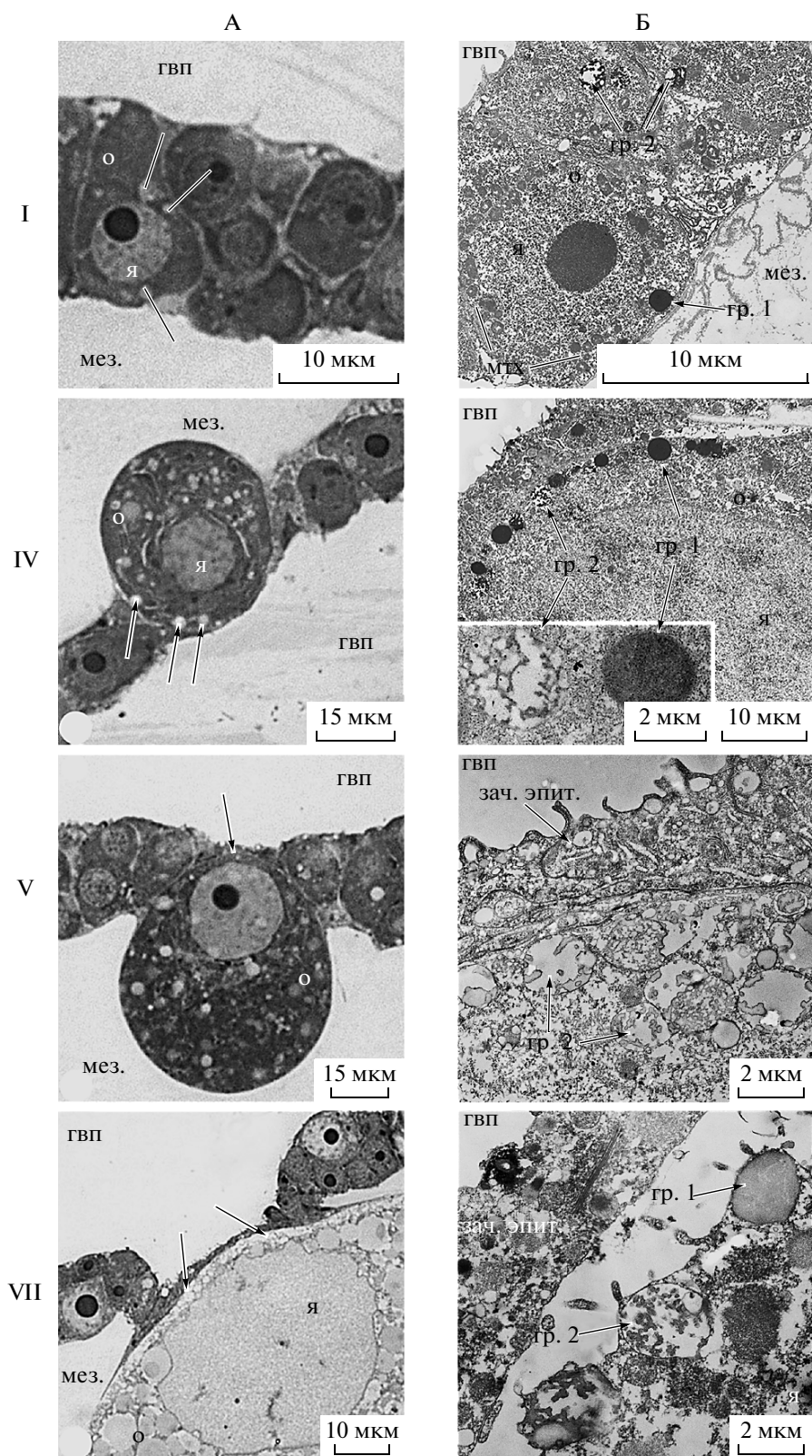


Рис. 2. Стадии развития ооцита сцифоидной медузы *Aurelia aurita* на светооптическом (А) и электронно-микроскопическом (Б) уровнях. I, IV, V и VII – стадии развития ооцита; Стрелками на полутонких (А) и ультратонких срезах (Б) указаны гранулы и формирующаяся пластинка в области контакта ооцита с зачатковым эпителием. гвп – гастровазкуляриная полость; гр. 1 – гранулы 1 типа; гр. 2 – гранулы 2 типа; зач. эп. – зачатковый эпителий; мез. – мезоглея; мтх – митохондрии; о – ооцит; я – ядро ооцита.

птиц, *вителлиновая оболочка* и *Zona Radiata* амфибий, моллюсков и ракообразных, *вителлиновый слой* иглокожих, а также *вителлиновая мембрана* и *хорион* некоторых насекомых из отряда Diptera (Tarin, Cano, 2000). Основными компонентами всех перечисленных яйцевых оболочек являются ZP-доменные гликопротеины. Однако, до сих пор у низших многоклеточных животных, в частности кишечнополостных, подобные структуры или белки не были описаны.

Наличие пластинки контакта у *Aurelia aurita* вызывает ряд вопросов. Очевидно, что пластинка является именно пластинкой, а не покрывает весь ооцит в отличие от других типов яйцевых оболочек. По аналогии с данными о синтезе и формировании яйцевых оболочек (Wassarman, 2009, Tarin, Cano, 2000) можно полагать, что собственно пластинка является внеклеточной структурой, но синтез ее компонентов идет в цитоплазме ооцита. Об этом свидетельствует цитоплазматическая локализация гранул на ранних стадиях развития ооцита и подготовка гранул к экзоцитозу на последней стадии (рис. 2).

В области контакта ооцита с герминативным эпителием самок сцифомедузы *A. aurita* ранее описывали структуру, которую мы определяем как пластинку контакта (Eckelbarger, Larson, 1988). Авторы предполагали, что данная структура — это определенным образом организованный желток. Они описали клетки герминативного эпителия, находящиеся в месте прикрепления ооцита, названные “трофоцитами”. Согласно гипотезе авторов именно эти клетки являются источником желтка, поступающего в ооцит. Однако, по нашим наблюдениям, синтетический аппарат “трофоцитов” развит недостаточно для выполнения трофической функции. Подобные клетки ранее были названы “клетками-няньками” (Widersten, 1965). Но сделанное позже авторарадиографическое исследование трофических функций “клеток-нянек” не подтвердило их участия в процессах передачи питательных веществ и желтка ооциту (Avian et al., 1987). Гистохимические данные с использованием дифференциального окрашивания свидетельствуют о том, что химический состав пластинки и гранул отличен от окружающего их желтка (Адонин и др., 2009). Отсутствие трофических функций у “клеток-нянек” также свидетельствует в пользу синтеза материала пластинки самим ооцитом.

Преобразование гранул 2 типа (укрупнение, вакуолизация), а также объединение гранул 1 и 2 типов, вероятно, и приводит к образованию видимой на парафиновых (Адонин и др., 2009) и полутонких срезах (рис. 2А, VII) структуры — пластинки контакта. Однако точная локализация пластинки контакта в момент оплодотворения (внутри ооцита или вне его) до сих пор остается неясной.

Сыворотка RA47 была получена против мезоглеина (Shaposhnikova et al., 2005), в аминокислот-

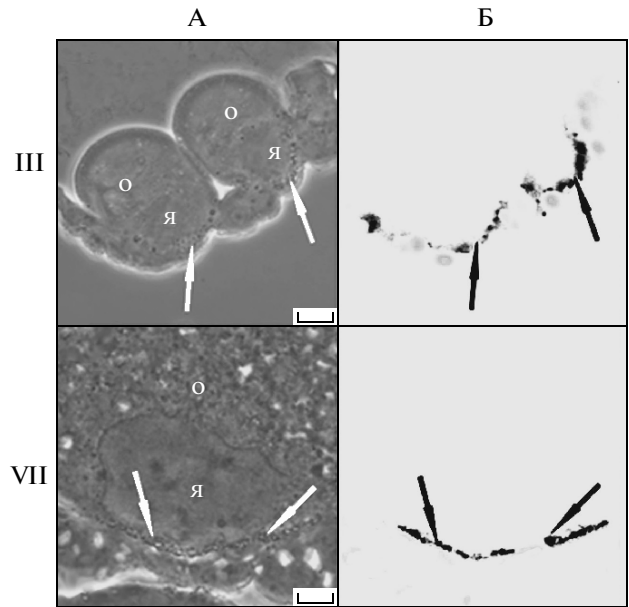


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание парафиновых срезов гонад самок сцифомедузы *Aurelia aurita* антителами к мезоглеину (RA47). А — фазовый контраст, Б — флуоресцентная микроскопия. III и VII — стадии развития ооцита; Стрелками указаны гранулы и формирующаяся пластинка в области контакта ооцита с зачатковым эпителием. о — ооцит; я — ядро ооцита.

ной последовательности которого обнаружен ZP-домен, составляющий более половины всего белка (Matveev et al., 2007). Весьма вероятно, что сыворотка содержит значительное количество антител именно против ZP-домена. Для проверки этого предположения был проведен частичный трипсинолиз мезоглеина с последующим разделением белковых фрагментов с помощью SDS-электрофореза по Лэммли. Результаты иммуноблоттинга показывают, что антитела связывают протеолитический фрагмент с молекулярной массой около 30 кДа, что соответствует расчетной массе ZP-домена — $250 \text{ aa} \times 110 \text{ Da} = 27 \text{ kDa}$, погрешность в пределах разрешающей способности метода (наши неопубликованные данные). Таким образом, частичный трипсинолиз вырезает из мезоглеина фрагмент с молекулярной массой, соответствующей ZP домену, и как раз этот фрагмент связывает антитела. Совпадение молекулярных масс триптического фрагмента и ZP-домена не является абсолютным доказательством направленности антител RA47 против ZP-домена, но повышает такую вероятность. В дальнейшем мы предполагаем провести белковое секвенирование иммунореактивного фрагмента.

На иммуноблоте после SDS-электрофореза гомогената гонад самок медузы *A. aurita* антитела из сыворотки RA47 связываются двумя иммунореактивными белковыми зонами. Их относительные молекулярные массы составляют 180 и 210 кДа

(Адонин и др., 2009), т.е. больше, чем мезоглеина (молекулярная масса 47 кДа). По-видимому, белки именно из этих зон входят в состав специфических гранул ооцита и пластинки контакта. Вероятно, в пластинке контакта и гранулах-предшественниках присутствуют белки, в состав которых входит ZP-домен, но, в соответствии с их молекулярной массой, они могут содержать и другие функциональные домены.

Возможны два объяснения различий в молекулярных массах мезоглеина и белков гонад. Во-первых, для ZP-белков характерны пост-трансляционные изменения (Jovine et al., 2005). Мезоглеин подвергается модификациям при включении в мезоглею (Shaposhnikova et al., 2005). Вторая возможность состоит в том, что белки гонад могут оказаться другими представителями ZP-семейства. Геномы большинства животных, представленных в базах данных, содержат более одного гена ZP-доменного белка. Наличие ZP-белков, специализированных для участия в оплодотворении, кажется более вероятным, и мы предполагаем проверить такую возможность.

При оплодотворении у представителей класса Scyphozoa, как и у большинства Cnidaria, сперматозоид контактирует с яйцеклеткой только на одном полюсе (Arai, 1997). Процессу оплодотворения у *A. aurita* предшествует уплощение клеток зачаткового эпителия в месте прикрепления ооцита (рис. 2А, IV, V, VII). В месте контакта ооцита с зачатковым эпителием уплощенные клетки образуют воронкообразные углубления. Мы наблюдали в них *in vivo* скопления сперматозоидов, что согласуется с описаниями (Иванова-Казас, 1975). Соответственно, способ прикрепления яйцеклетки к эпителию и находящиеся в этом месте структуры могут иметь принципиальное значение для процесса оплодотворения. Ооцит ориентирован таким образом, что пластинка контакта экспонирована в сторону предполагаемого контакта со сперматозоидом (рис. 3).

Несмотря на 400 миллионов лет, прошедших после разделения предков форели и мыши, и на переход от внешнего оплодотворения и развития к внутреннему, белки оболочек яйца у форели и мыши имеют структурное сходство как между собой, так и с белками оболочек птиц и амфибий (Litscher, Wassarman, 1999). Эволюционный консерватизм отражает ключевую роль ZP-доменных белков при оплодотворении у многих животных. Их роль в формировании блестящей оболочки и при оплодотворении у млекопитающих изучена сравнительно хорошо. Они (в частности, ZP3 мыши) отвечают за первичное прикрепление сперматозоида и участвуют в процессе инициации акросомной реакции (Jungnickel et al., 2003). Обнаруженные в составе пластинки белки, по-видимому, являются ZP-домен-содержащими, поэтому можно предположить, что пластинка пластинка играет

определенную роль в процессе контакта сперматозоида и ооцита. Пластинка маркирует и сужает область контакта; ядро находится в непосредственной близости к пластинке, которая ориентирована в просвет кармана, к потоку морской воды, несущему сперматозоиды (рис. 1). Экспериментальный материал для проверки такого сценария оплодотворения получен. Более высокая молекулярная масса ZP-доменных белков гонад по сравнению с мезоглеином предполагает существование в них других доменов, выполняющих, например, рецепторные функции распознавания сперматозоида.

Пластинка контакта, покрывающая только анимальный полюс ооцита, но обнаруженная по наличию ZP-доменных белков, может оказаться простейшей структурой среди эволюционно более продвинутых яйцевых оболочек и представлять собой некий аналог этих оболочек у *Aurelia aurita*.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 07-04-10086-к, 09-04-01145-а) и Правительства Санкт-Петербурга (проект № 2.6/4-05/85).

Авторы признательны коллективу Беломорской биологической станции Картеш Зоологического института РАН за теплый прием и постоянную поддержку, к.б.н. с.н.с. Института цитологии РАН Почукалиной Г.Н. за ценные замечания и консультации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chapman D.M. Cnidarian histology. Coelenterate biology. Reviews and new perspectives. Eds. Muskatine L., Lenhoff H. Acad. Press. NY-SF-London. 1974. P. 1-93.
- Cnidaria. In: Microscopic anatomy of invertebrates. Harrison, F.W. and Westfall, J.A. (Eds.), Volume 2: Placozoa, Porifera, Cnidaria, and Ctenophora. Wiley-Liss, New York, 1991. P. 91-358.
- Bouillon J., Coppois G. Etude comparative de la mesoglee des cnidaires // Cahiers Biol. Marine. 1977. V. 13. P. 339-368.
- Weber C., Schmid V. The fibrous system in the extracellular matrix of hydromedusae // Tissue and Cell. 1985. V. 17. P. 811-822.
- Chapman G. The structure and function of the mesoglea. Cnidaria and their evolution, ed. Rees. Symp. Soc. London. 1966. V. 16. P. 147-168.
- Заварзин А.А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. М.: Медгиз, 1945.
- Matveev I.V., Shaposhnikova T.G., Podgornaya O.I. A novel *Aurelia aurita* protein mesoglein contains DSL and ZP domains // Gene. 2007. V. 399. P. 20-25.
- Shaposhnikova T., Matveev I., Napara T., Podgornaya O. Mesogleal cells of the jellyfish *Aurelia aurita* are involved in the formation of mesogleal fibres // Cell Biol. Int. 2005. V. 29. № 11. P. 952-958.
- Кэтти Д., Райкундалия Ч., Браун Дж., Линг Н.Р., Гордон Д., Арвие Ж., Уильяме А.Ф. Антитела. М.: Мир. 1991. 287 с.

- Пурс Э. Гистохимия, Москва: Издательство иностранной литературы. 1962. 964 с.
- Arai M.N. A functional biology of Scyphozoa. Chapman and Hall, 1997.
- Jovine L., Costel C., Darie, Eveline S., Litscher, Paul M., Wassarman. Zona pellucida domain proteins. Annu. Rev. Biochem. 2005. V. 74. P. 83–114.
- Wassarman P., Chen J., Cohen N., Litscher E., Liu C., Qi H., Williams Z. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida // J. Exp. Zool. 1999. V. 285. P. 251–258.
- Tarin J.J., Cano A. Fertilization in Protozoa and Metazoan Animals. Springer. 2000.
- Wassarman P.M. Mammalian fertilization: the strange case of sperm protein 56 // BioEssays. 2009. V. 31. № 2. P. 153–158.
- Адонин Л.С., Подгорная О.И., Матвеев И.В. и др. Пластика в зоне контакта ооцита с зачатковым эпителием у сцифомедузы *Aurelia aurita* имеет иммунологическое сходство с ZP-домен-содержащим белком мезоглеином // Цитология. 2009. Т. 51. № 5. С. 435–442.
- Morandini A.C., Da Silveira F.L. Sexual reproduction of *Nausithoe aurea* (Scyphozoa, Coronatae). Gametogenesis, egg release, embryonic development, and gastrulation // Sci. Mar. 2001. V. 65. № 2. P. 139–149.
- Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных. Новосибирск: Наука, 1975. 372 с.
- Eckelbarger K.J., Larson R.J. Ovarian morphology and oogenesis in *Aurelia aurita* (Scyphozoa: Semaestomeae): ultrastructural evidence of heterosynthetic yolk formation in a primitive metazoan // Mar. Biol. 1988. V. 100. P. 103–115.
- Eckelbarger K.J., Larson R.J. Ultrastructure of the ovary and oogenesis in the jellyfish *Linuche unguiculata* and *Stromolophus meleagris*, with a review of ovarian structure in the Scyphozoa // Mar. Biol. 1992. V. 114. P. 633–643.
- Wassarman P.M., Jovine L., Litscher E.S. A profile of fertilization in mammals // Nat. Cell Biol. 2001. V. 3. P. E59–E64.
- Widersten A. Genital organs and fertilization in some Scyphozoa // Zool. Bidrag Uppsala. 1965. V. 37. P. 45–58.
- Avian M., Micali F., Sciancalepore M. Vitellogenesis in *Pelagia noctiluca* primi risultati di eucitocy autoradiografiche. Atti della Accademia delle Scienze dell'Istituto di Bologna Classe di Scienze Fisiche Rendiconti. 1987 V. 3. P. 139–146. In Italian; English abstract.
- Litscher E.S., Qi H., Wassarman P.M. Mouse zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 undergo carboxy-terminal proteolytic processing in growing oocytes // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 12280–12287.
- Jungnickel M.K., Sutton K.A., Florman H.M. In the beginning: lessons from fertilization in mice and worms // Cell. 2003. V. 114. P. 401–404.

Morphodynamics of the Contract Plate in the Course of Oocyte Maturation in the Scyphozoan *Aurelia aurita* (Cnidaria: Semaestomeae)

L. S. Adonin^{a,b}, O. I. Podgornaya^{a,b}, and T. G. Shaposhnikova^a

^a Department of Cytology and Histology, St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 190034 Russia

^b Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St. Petersburg, 194064 Russia

e-mail: leo.adonin@gmail.com

Abstract—The structure forming in the area of contact between the oocyte and the germinal epithelium in the course of oocyte maturation of the scyphozoan *Aurelia aurita* is termed the contact plate. This study traces the successive stages of contact plate formation in the course of oocyte maturation at the light microscopic and ultrastructural levels. At early stages of oocyte development, the appearance of granules is observed in the peripheral cytoplasm of the oocyte; these granules accumulate at the pole, which retains its connection with the germinal epithelium of the gonads. Two types of these granules are recognized: (1) granules with homogeneous content and (2) granules containing loose shapeless material in the form of thick cords. The transformation of type two granules into larger structures, as well as the consolidation of type one and type two granules at later stages of oocyte development, are probably the processes that lead to the formation of the characteristic structure and contact plate, visible in paraffin and semithin sections. It remains unclear where exactly the contact plate is localized at the moment of fertilization: inside or outside the oocyte. The content of granules and components of the plate specifically bind the antibodies (RA47) against mesoglein, the ZP domain-containing protein of the mesoglea of *A. aurita*. The contact plate, covering only the anomalous pole of the oocyte but detected by the presence of ZP domain-containing proteins, may prove to be the simplest egg membrane of the zona pellucida type.

Keywords: *Aurelia aurita*, extracellular matrix, mesoglein, ZP domain-containing proteins