

УДК 591.169:591.3:591.4

ВОССТАНОВЛЕНИЕ НЕРВНОЙ И МЫШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ В ХОДЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОЛИХЕТЫ *ALITTA VIRENS* (ANNELIDA: NEREIDIDAE)

© 2017 г. В. В. Козин, Н. А. Филиппова, Р. П. Костюченко*

Санкт-Петербургский государственный университет
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9

*E-mail: r.kostyuchenko@spbu.ru

Поступила в редакцию 01.10.2016 г.

Регенерация утраченных сегментов у полихет является не только ярким примером эпиморфного воссоздания органов и тканей, но и перспективным объектом для изучения позиционной информации и механизмов поддержания целостности состава тела. С целью создания удобной стандартизованной модели нами описана динамика восстановления основных анатомических структур и разработана система стадирования задней регенерации *Alitta virens*. В среднем нормальное строение заднего конца тела восстанавливается через 10 дней после ампутации (дпа). Весь процесс регенерации был разделен на 5 стадий: (1) заживление раны (0–1 дпа), (2) формирование бластемы (1–2 дпа), (3) паттернирование и рост бластемы (2–3 дпа), (4) дифференциация первого регенерированного сегмента (3–5 дпа), (5) формирование и дифференциация последующих 5–6 сегментов (5–10 дпа). Регенерация преимущественно идет по типу эпиморфоза, хотя отмечены элементы вставочного роста и морфаллактические преобразования культи. На стадиях 1–3 появляются терминальные структуры пигидия (мышцы анального сфинктера, полость пигидия, циркумпигидиальное нервное кольцо, пигидиальные цирры), а затем (со стадии 3) кпереди от него закладываются новые метамеры. Дифференцировка первого новообразованного сегмента связана с перестройкой старых тканей последнего сегмента. Образование последующих сегментов подобно ускоренному постларвальному росту. Нервные элементы регенерата развиваются быстрее окружающих их мышц. Нейриты от обрубленных ЦНС и ПНС выходят на поверхность раневого эпителия уже на стадии 1. Далее нервные отростки от ЦНС удлиняются и утолщаются вместе с ростом регенерационной почки. Ганглий, параподиальные нервы, косые мышцы и целомы первого сегмента выявляются уже на стадии 4. Продольные мышцы регенерируют в переднезаднем направлении, непрерывно контактируя с соответствующими волокнами старых тканей. Остальные мышцы дифференцируются из клеток бластемы вне связи со старой мускулатурой культи. Полученные данные позволяют использовать регенерацию заднего конца тела *A. virens* в качестве экспериментальной модели для решения актуальных проблем биологии развития.

Ключевые слова: регенерация, восстановительный морфогенез, дифференциация клеток, нейрогенез, брюшная нервная цепочка, мускулатура, ацетилированный α -тубулин, фаллоидин, конфокальная микроскопия, *Nereis*, Polychaeta, Spiralia, Lophotrochozoa

DOI: 10.7868/S0475145017030089

ВВЕДЕНИЕ

Посттравматическая регенерация является важнейшей моделью реактивации программ развития у взрослых особей. Примечательно, что восполнение функции не всегда происходит за счет полноценного копирования изначальной анатомической структуры (Короткова, 1997). Значительную пластичность при регенерации проявляют и клеточные и молекулярные механизмы. Сравнительные данные по регенерации животных из разных таксонов дают представление о степени этой пластичности и создают фундамент для разработки прикладных задач регенеративной биомедицины.

Полихеты – одни из наиболее высокоорганизованных животных, способных восстанавливать практически все ткани и органы. Однако у разных видов на разных этапах онтогенеза регенеративные потенции могут сильно варьировать (Короткова, 1997; Bely, 2006). Эти особенности, а также консерватизм паттернов эмбрионального развития, ясно определенное филогенетическое положение, хорошо изученное универсальное строение сегментов и относительное удобство для экспериментальной работы делает полихет чрезвычайно привлекательным объектом исследований.

Несмотря на более чем вековую историю изучения регенерации полихет, этот феномен оста-

ется малопонятным и на организменном, и на клеточном, и на молекулярно-генетическом уровне (Nyman, 1940; Herlant-Meewis, 1964; Костюченко и др., 2016; Özpolat, Bely, 2016). Зачастую в описательных работах прошлых десятилетий разные объекты и методики приводили авторов к противоречивым выводам. Появление современных технических средств, таких как конфокальная микроскопия (Müller, Henning, 2004) и прижизненное неинвазивное мечение с помощью трансгенеза (Backfisch et al., 2014) позволяет совершенно новому подойти к описанию событий и механизмов регенерации полихет.

Актуальной задачей является всесторонняя разработка моделей регенерации на организменном уровне. Нереидные полихеты, способные к восстановлению заднего конца тела, имеют все подходящие для этого атрибуты. Для этих червей хорошо изучены анатомия, репродукция, эмбриогенез и некоторые аспекты регенерации (Smith, 1957; Mettam, 1967; Storch, 1968; Combaz, Boilly, 1974; Fischer, 1999; Dorresteijn, 2005). Известно, что регенерация нереид возможна лишь в ювенильный период развития и при сохранении в ране обрубленного конца брюшной нервной цепочки (БНЦ), что связано с наличием сложной нейрогуморальной регуляции (Golding, 1967; Combaz, Boilly, 1974; Короткова, 1997). Кроме того, в БНЦ нереид экспрессируются важные компоненты системы позиционной информации — *Hox* гены. После ампутации заднего конца тела они кардинально меняют паттерны своей активности (Pfeifer et al., 2012; Novikova et al., 2013), что говорит о происходящем в старых тканях морфаллаксисе — практически неописанному явлению для эррантных полихет.

Мышечная система также существенно перестраивается в процессе регенерации (Herlant-Meewis, 1964; Fontés et al., 1983; Weidhase et al., 2014). Так, у планарий именно мышцы обеспечивают систему молекулярных координат, необходимых для регенерации (Witchley et al., 2013). Аксолотли с мутацией *short toes* (*s/s*) демонстрируют четкую корреляцию между дефицитом мышц и их стволовых элементов и резко ослабленной способностью восстанавливать утраченные конечности (Sato, Chernoff, 2007). Известно, что у многих видов полихет миоциты участвуют в создании регенерационной бластемы (пула недифференцированных внутренних клеток). Тем не менее, для нереид до сих пор не выполнено подробного описания регенерации с реконструкцией трехмерной структуры нервной и мышечной системы. Неизвестны строгие временные параметры восстановления анатомических структур и оптимальные условия для стандартизации процесса. С целью создания удобной модели нами разработана система стадирования задней регенерации *Alitta virens* (ранее *Nereis virens*) на основе выявления

нейропиля и мышечных волокон тканеспецифичными флуоресцентными маркерами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нерестящихся эпитокных особей *A. virens* отлавливали в летний период в окрестностях Морской биологической станции СПбГУ на Белом море. Лабораторную культуру зародышей получали с помощью искусственного оплодотворения (Дондуа, 1975). Животных выращивали в течение 2–3 мес. в небольших аквариумах с натуральной или искусственной морской водой. Ювенильных *A. virens* также собирали на илисто-песчаной литорали, промывая грунт ситом 0.5 мм.

У особей длиной 15–25 сегментов лезвием бритвы ампутировали заднюю треть тела. Животных предварительно анестезировали в растворе 7.5% MgCl₂, смешанном с искусственной морской водой (1 : 1). Операцию проводили под контролем бинокулярной лупы так, чтобы разрез проходил по межсегментной борозде. Регенерировавших животных содержали при 18°C в пластиковых чашках Петри по 5–10 шт. По достижении необходимого срока особей анестезировали и фиксировали в 4% формалине на 1.75× фосфатном буфере в течение ночи при 4°C. После отмычки в фосфатном буфере материал переводили в 70% этанол и хранили при –20°C или сразу использовали для окраски фаллоидином.

Иммуноцитохимическое выявление тубулина и окраску ДНК с помощью DAPI проводили, как описано ранее (Kozin et al., 2016). Первичные мышиные антитела к ацетилированному α-тубулину (Sigma T6793) разводили 1 : 200, вторичные противомышечные, конъюгированные с Cy5 (Jackson ImmunoResearch 715-175-150) — 1 : 400. Для мечения F-актина использовали конъюгированный с AF488 фаллоидин (Molecular Probes) в концентрации 5 единиц на мл. Окраску проводили в течение 2 ч при комнатной температуре, после чего отмывали как от вторичных антител и заключали в 90% глицерин.

Объекты монтировали между двух покровных стекол и анализировали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5. Для каждой стадии и окраски было проанализировано не менее 15 объектов. Полученные изображения обрабатывались в программах Adobe Photoshop, Adobe Illustrator и ImageJ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

*Строение заднего конца тела *A. virens**

На протяжении ювенильного периода жизни *A. virens* задний конец тела червя представляет собой центр образования новых сегментов. Размер сегментов и степень развитости их придатков градуально уменьшается в заднем направлении, так что самые терминальные зачатки сегментов пло-

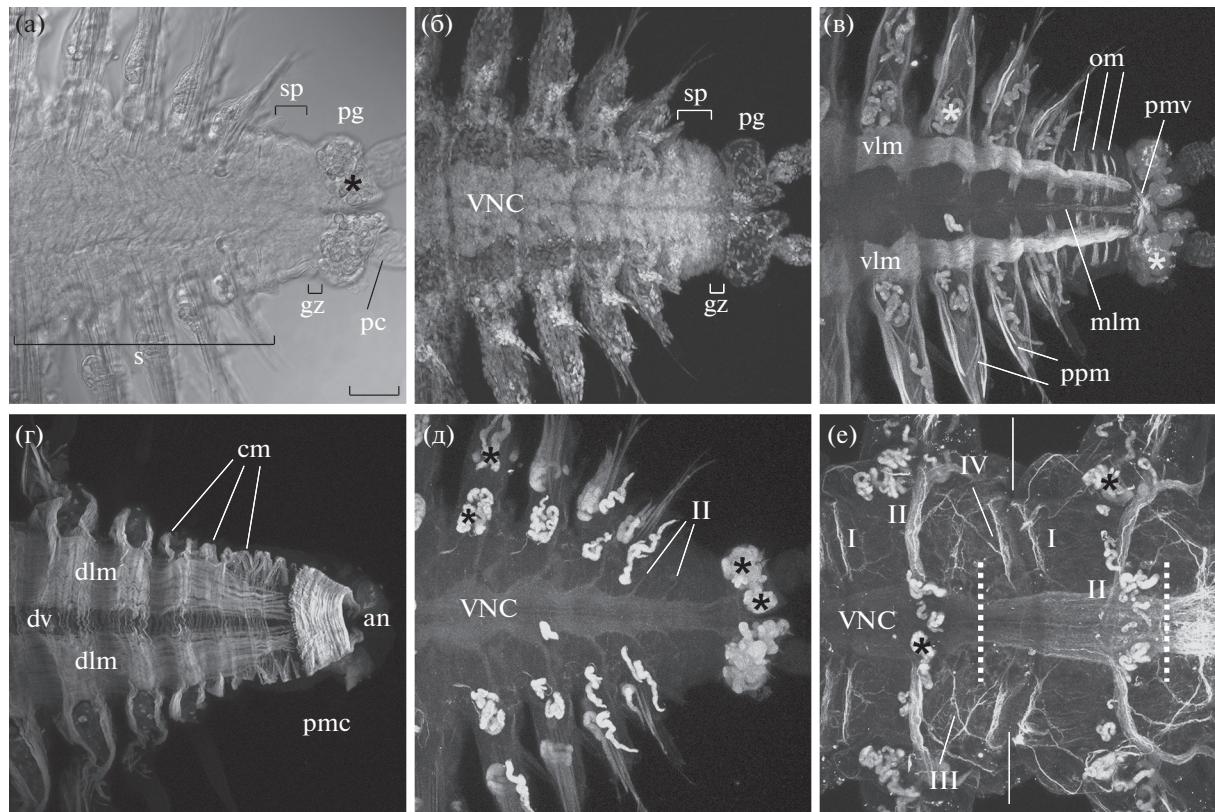


Рис. 1. Анатомия ювенильных 20-ти сегментных *A. virens*. В этом и следующих рисунках передний полюс слева, если не обозначено иное. (а–д) – задний конец тела; (е) – сегменты середины тела. (а) – световая микроскопия; (б–е) – максимальная проекция конфокального Z-стека: (б) – окраска ядер DAPI; (в, г) – окраска мышц фаллоидином; (д, е) – окраска нейропилия антителами к ацетилированному α -тубулину. (а–в, д, е) – вид с вентральной стороны; (г) – вид с дорсальной стороны. I, II, III, IV – сегментные нервы БНЦ; an – анальное отверстие; cm – кольцевые мышцы; dlm – дорсальные продольные мышцы; dv – дорсальный кровеносный сосуд; gz – зона роста; om – косые мышцы; pc – пигидиальные цирры; pg – пигидий; pmc – кольцевые мышцы пигидия; pmv – вентральная мышечная сеть пигидия; ppm – параподиальные мышцы; s – сегменты с параподиями; sp – зачатки сегментов; mlm – вентральная медиальная продольная мышца; VNC – БНЦ; звездочка – автофлуоресценция экзокринных желез; сплошная вертикальная линия – граница между сегментами, вдоль которой проводилась ампутация; пунктирная вертикальная линия – граница между ганглиями БНЦ. Масштаб 50 мкм.

хо различимы и не образуют внешних борозд (рис. 1). Плотность клеток здесь наиболее высока (рис. 1б). Медиально закладываются ганглии БНЦ, латеральнее – зачатки параподий. Клеточный материал для формирования сегментов продуцируется зоной роста, расположенной субтерминально. В этом участке плотность клеток заметно меньше, чем спереди от него (рис. 1б). Терминально к зоне роста примыкает пигидий, разделенный с вентральной стороны продольной бороздкой на две лопасти. В пигидии плотность клеток еще меньше, чем в зоне роста, что связано с наличием в нем крупных экзокринных желез. Терминально пигидий несет нитевидные придатки – пигидиальные цирры. С дорсальной стороны пигидий открывается анальным отверстием. Оно окружено мощным слоем кольцевых мышц (рис. 1г), который по данным Старунова и Лавровой (2013) составляет стенку полости пигидия, выполняя роль сфинктера.

Строение нервной системы, выявленное с помощью антител к ацетилированному α -тубулину, соответствует классическим описаниям для нереидных полихет (Hamaker, 1898; Smith, 1957). БНЦ расположена субэпителиально и состоит из ганглиев, связанных продольными коннективами (рис. 1д). Центральную часть ганглия занимает нейропиль, а тела нейронов расположены по периферии – на вентральной и латеральных сторонах БНЦ. От ганглиев латерально отходит по четыре пары нервов, обозначаемых римскими цифрами. По номенклатуре Смита (Smith, 1957) нумерация начинается от границы сегмента, но поскольку небольшая часть каждого ганглия БНЦ лежит в предшествующем сегменте, IV пара нервов (последняя в сегменте) является самой передней, считая от начала ганглия (рис. 1е). Наиболее мощными являются параподиальные нервы (II пара). Эти нервы выявляются в зачатках сегментов еще до начала образования в них параподий (рис. 1д). Терминально БНЦ раз-

деляется на пару продольных нервных стволов (латеральных нервов), идущих в пигидиальные цирры. Строго в заднем направлении от БНЦ отходит медиальный непарный нерв, который доходит до уровня зоны роста. Вблизи передней границы пигидия продольные нервные стволы соединены на брюшной стороне пигидиальной комиссурой, а латерально и на спинной стороне их связывает циркумпигидиальное нервное кольцо (не показано), описанное ранее (Старунов, Лаврова, 2013). С этим кольцом и сегментными нервами связана субэпителиальная сеть нейритов, относящаяся к периферической нервной системе (ПНС).

Основные элементы мышц стенки тела, выявленные фаллоидином, включают две пары продольных лент (центральные и дорсальные), центральную медиальную продольную мышцу, отходящие от нее в стороны косые мышцы, кольцевые мышцы и мышцы параподиального комплекса (рис. 1в, 1г). Самые наружные — кольцевые мышцы — хорошо видны в дорсальной проекции, латерально они огибают параподии и идут по границам сегментов, а на центральной стороне эти мышцы доходят до медиальной границы продольных мышц и прерываются БНЦ. Под слоем кольцевой мускулатуры залегают продольные мышечные ленты, оканчивающиеся сзади на уровне зоны роста. На центральной стороне они лежат по бокам от БНЦ и постепенно сужаются кзади (рис. 1в). Дорсально продольные мышцы гораздо шире и отделены друг от друга дорсальным сосудом (рис. 1г). Пучки косых мышц маркируют границы сегментов. Кзади от последнего сегмента с зачатками параподий можно насчитать еще 3–4 метамера, ограниченных косыми мышцами (рис. 1в).

Мышечные элементы пигидия помимо упомянутых кольцевых мышц анального сфинктера, включают разнонаправленные пучки в передней центральной части пигидия (рис. 1в). Последние сочленены с центральной медиальной продольной мышцей, но не контактируют с продольными мышечными лентами. По-видимому, центральная мышечная сеть в основании пигидиальных цирр предназначена для манипуляций ими. Кзади от указанной сети в дорсальном направлении отходит двойной слой кольцевых мышц, охватывающих заднюю кишку (рис. 1г). Этот анальный сфинктер имеет форму тороида, более интенсивная окраска фаллоидином наблюдается в наружном его листке. Плотность кольцевых мышц пигидия несопоставимо выше, чем в сегментах тела. Спереди к анальному сфинктеру вплотную подходят дорсальные мышечные ленты.

Стадирование и морфологические особенности задней регенерации

Проанализировав события задней регенерации у молодых ювенильных *A. virens*, мы выделили пять стадий. В среднем восстановление нормального строения заднего конца тела происходит через 10 дней после ампутации (дпа). Примерно с середины этого периода (с пятого дпа) наблюдается существенная вариабельность зрелости регенерата, что вероятно зависит от физиологического состояния индивидуумов.

Стадия 1 (0–1 дпа) — заживление раны. Сразу после ампутации происходит сокращение кольцевой мускулатуры последнего сохранившегося сегмента. Обрубленный конец кишки выворачивается наружу, немного выпячиваясь из раны на дорсальную и латеральные стороны. Так происходит первичное закрытие раны. Отверстие кишки располагается ближе к спинной поверхности, т.к. на брюшной стороне кольцевые мышцы прерываются БНЦ, и сжатия стенки тела здесь не происходит. К концу первого дпа можно наблюдать, что эпидермис кольцеобразно срастается с кишечной выстилкой, так что образуется сплошной раневой эпителий (рис. 2а, 2б). На дорсальной стороне и по контуру раны отмечена продольная складчатость кутикулы и покровов последнего сегмента, поскольку кольцевая мускулатура здесь остается в сокращенном состоянии.

Стадия 2 (1–2 дпа) — формирование бластемы. Во время вторых суток регенерации начинается эпиморфное новообразование структур регенерата — покровного эпителия и лежащей под ним бластемы. Ко второму дпа на месте раны формируется небольшая регенерационная почка (рис. 2в, 2г). Покрывающий ее однослойный эктодермальный эпителий полностью замещает выпяченную в прошлом стенку кишки. Покровный эпителий существенно утолщается и синтезирует кутикулу. Небольшое внутреннее пространство регенерационной почки заполнено плотно лежащими клетками бластемы (рис. 2г). Бластемные массы в основном формируются центральнее и по бокам от кишки. Как показано нами ранее, в это время в регенерационной почке активно происходит клеточная пролиферация (Kozin, Kostyuchenko, 2015). Наиболее интенсивно делятся клетки покровного эпителия задней части регенерата.

Стадия 3 (2–3 дпа) — паттернирование и рост бластемы. Третий сутки регенерации знаменуются развитием гетерогенности вдоль переднезадней оси на фоне продолжающегося роста регенерационной почки. К трем дпа регенерат немного удлиняется (рис. 2д–2з). Плотность клеток в задней трети регенерата несколько меньше (рис. 2е). Здесь формируется щелевидная полость пигидия. По бокам от ануса ближе к брюшной поверхности появляются короткие отростки — зачатки пигидиальных цирр. У

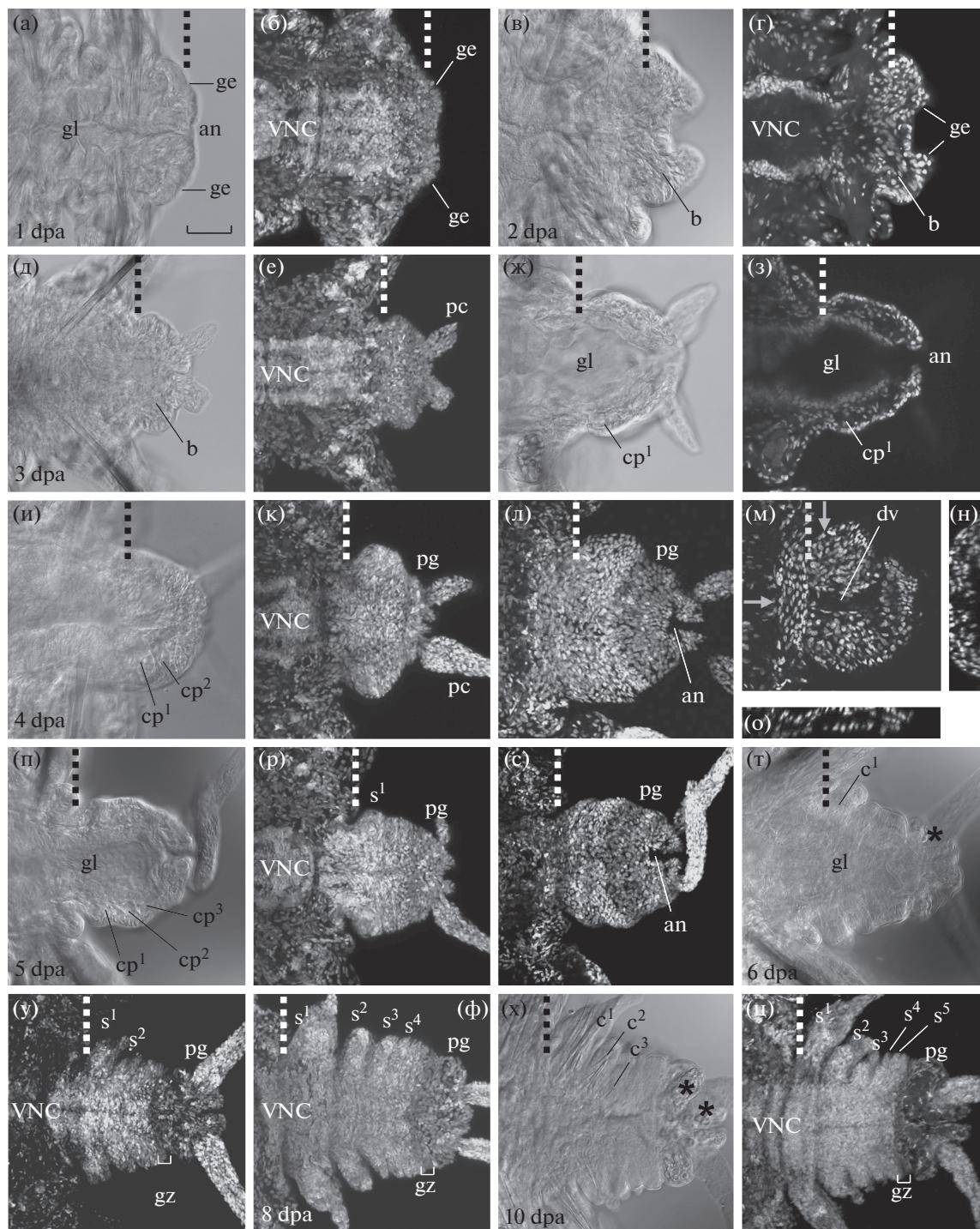


Рис. 2. Морфологическое строение регенератов на различных стадиях. (а, б) – стадия 1, 1 дпа; (в, г) – стадия 2, 2 дпа; (д–з) – стадия 3, 3 дпа; (и–с) – стадия 4: (и–о) – 4 дпа; (п–с) – 5 дпа; (т–ц) – стадия 5: (т, у) – 6 дпа; (ф) – 8 дпа; (х, ц) – 10 дпа. (а, в, д, ж, и, п, т, х) – световая микроскопия; (б, г, е, з, к–о, р, с, у, ф, ц) – окраска ядер DAPI; (б, е, к, л, р, с, у, ф, ц) – максимальная проекция конфокального Z-стекла; (г, з, м) – отдельный конфокальный снимок; (н, о) – ортогональная проекция конфокального Z-стекла (л) на уровнях, отмеченных стрелками на (м); (н) – виртуальный попечерный срез, дорсальная сторона слева; (о) – виртуальный продольный срез, дорсальная сторона сверху. (а–е, и, к, р, т–ц) – вид с вентральной стороны; (ж, з, л, м, п, с) – вид с дорсальной стороны. ап – анальное отверстие; б – blastema; с – четы; сп – целомический мешок; дра – дпа; dv – дорсальный кровеносный сосуд; ge – место срастания кишечного и покровного эпителия; gl – просвет кишок; gz – зона роста; pc – пигидиальные цирры; pg – пигидий; с – сегменты, ограниченные внешними бороздами; VNC – БНЦ; звездочка – экзокринные железы; пунктирная вертикальная линия – уровень ампутации; надстрочные цифры – номера регенерировавших сегментов, которым принадлежат обозначенные буквами структуры. Масштаб 50 мкм.

наиболее продвинутых регенераторов отмечен дорсальный сосуд и первая пара целомических мешков с небольшой полостью (рис. 2ж, 2з).

Стадия 4 (3–5 дпа) – дифференциация первого регенерированного сегмента. За четвертые и пятые сутки регенерации происходит морфологическое обособление первого новообразованного метамера и дифференциация его нервных и мышечных элементов.

К четвертому дпа размеры регенерационной почки могут варьировать, но она всегда заметно больше и в длину, и в ширину, чем сутками ранее (рис. 2и–2л). Терминально оформляется пигидий, который хорошо отличим пониженней плотностью клеток и отделен от остального регенерата пологой бороздой (рис. 2к, 2л). Пигидиальные цирры значительно удлиняются. Клетки бластемы кпереди от пигидия дифференцируются в мезодермальном направлении. Появляются первые сегментные мышцы (см. ниже). По бокам от кишечника в передней части регенерата можно обнаружить 1–2 пары целомических мешков (рис. 2и). По медиальной линии регенерата хорошо просматривается дорсальный кровеносный сосуд, который Т-образно расширяется на заднем конце и, по-видимому, впадает в терминальный синус на границе пигидия (рис. 2м–2о).

На пятый дпа регенерационная почка приобретает коническую форму, плавно сужаясь к заднему концу (рис. 2п–2с). На спинной поверхности пигидия появляется продольная складчатость. Продолжается удлинение и утончение пигидиальных цирр. В их основании медиально и латерально закладываются экзокринные железы. Между кишкой и внутренней стенкой полости пигидия проходит терминальный кровеносный синус, соединяющийся с дорсальным сосудом. На вентральной и латеральной сторонах регенерата образуется поперечная борозда, отделяющая первый новый сегмент (рис. 2р, 2с). Сзади от нее намечается второй новый сегмент, значительно уже первого. В сегментной части регенерата просматривается 2–3 пары целомов с отдельными клетками внутри.

Стадия 5 (5–10 дпа) – формирование и дифференциация последующих 5–6 сегментов. С шестых по десятые сутки регенерации за счет работы зоны роста продолжается удлинение и последовательная сегментация регенерационной почки, создается переднезадний градиент зрелости метамеров, характерный для нормального постларвального развития. На шестой дпа кпереди от пигидия по пониженней плотности клеток становится хорошо различима зона роста (рис. 2у). Поверхностные борозды опоясывают сначала два новых сегмента. В первом из них латерально в стенке тела (внутри хетоносных мешков) появляются короткие ацикулы (рис. 2т). По бокам и с дорсальной стороны к кишке примыкают три пары целомических мешков. Их

объем возрастает, а внутри скапливаются свободные палочковидные клетки. К восьмому дпа образуется до четырех сегментов с внешними бороздами (рис. 2ф). В первом сегменте регенерата начинается формирование параподий, пучки хет не выходят за их пределы. Иногда хеты также просматриваются во втором новом сегменте. У десятидневных регенераторов можно насчитать до пяти обособленных бороздами сегментов, в передних 3–4 закладываются параподии и хеты (рис. 2х, 2ц). Хеты первого сегмента вырастают за пределы стенки тела. Экзокринные железы разрастаются по всей вентральной поверхности пигидия, что придает ему интактный вид. В среднем к концу десятидневного периода регенерат полностью восстанавливает все особенности строения заднего конца тела, так что отличить его от старых сегментов можно лишь по заметной разнице в размерах.

Динамика восстановления нервной системы

На стадии 1 раневой эпителий формируется непосредственно на обрубленной поверхности БНЦ. К первому дпа терминальный участок последнего ганглия, перерезанного в передней его части, начинает перестраиваться. Равномерное распределение иммунореактивных к тубулине нервных волокон сменяется более дисперсной и интенсивной окраской (рис. 3а), что говорит о локальном ремоделинге БНЦ. Иногда, в связи с неточным проведением операции, в БНЦ сохраняется I пара сегментных нервов (рис. 3а, 3в), которая позднее деградирует. Уже на стадии 1 нами отмечено, что раневой эпителий насквозь пронизывают нейриты, отходящие и от обрубленного конца БНЦ и от субэпителиальной сети ПНС последнего старого сегмента, включая отростки от IV пары нервов (рис. 3а, 3б).

На стадии 2 параллельно с формированием бластемы нервные волокна из старых тканей врастают в регенерат. Ко второму дпа от БНЦ в заднем направлении отходят отдельные нервы: мощная пара латеральных, один медиальный и пара тонких паравертикальных (рис. 3в, 3г, 3е). Достигнув базальной поверхности покровного эпителия, все эти нервы ветвятся, направляя нейриты сквозь него к поверхности тела. В местах выхода отростков латеральных нервов закладываются небольшие бугорки – место развития пигидиальных цирр (рис. 3е). На дорсальной стороне вдоль задней границы последнего сегмента выявляется субэпителиальный поперечный пучок нейритов (рис. 3д). Сзади от него отходят многочисленные продольные отростки, иннервирующие регенерат.

На стадии 3 продолжается рост и дифференциация новых проводящих нервных путей. На переднем конце регенерата между латеральными нервами БНЦ развивается плотная сеть продольных и поперечных (комиссуральных) нейритов (рис. 3ж, 3и). Сами латеральные нервы становят-

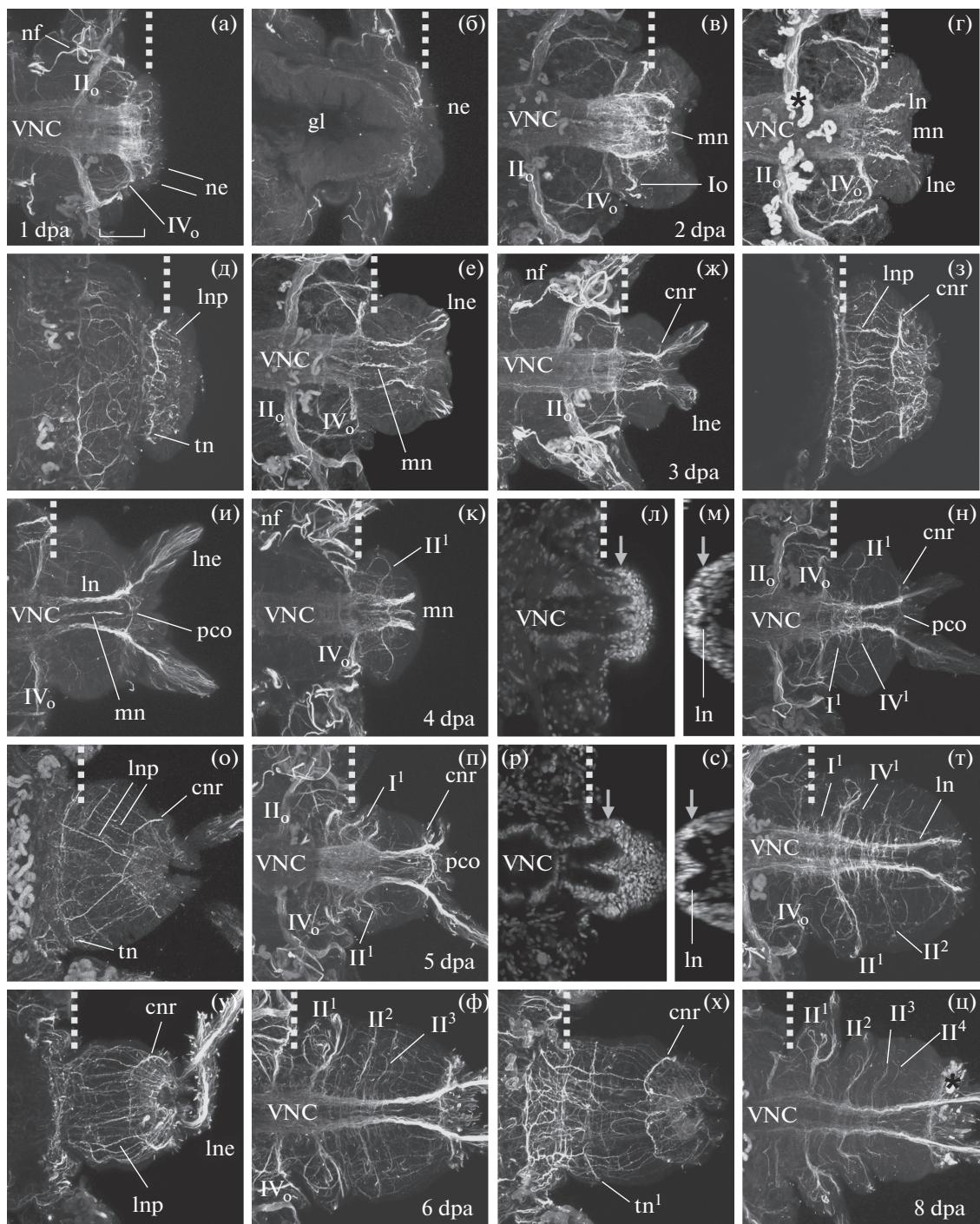


Рис. 3. Регенерация нервной системы. (а, б) – стадия 1, 1 дпа; (в–е) – стадия 2, 2 дпа; (ж–и) – стадия 3, 3 дпа; (к–и) – стадия 4; (к–о) – 4 дпа; (п–у) – 5 дпа; (ф–ц) – стадия 5; (ф, х) – 6 дпа; (и) – 8 дпа. (а–к, н–п, т–ц) – окраска нейропилия антителами к ацетилированному α -тубулину, максимальная проекция конфокального Z-стека; (л, м, р, с) – окраска ядер DAPI; (л, р) – отдельный конфокальный снимок; (м, с) – виртуальный поперечный срез конфокального Z-стека на уровне первой пары параподиальных нервов (II^1), уровень отмечен стрелкой на (л, р), вентральная сторона слева. (а, в, г, ж, и–л, н, п, р, т, ф, и) – вид с вентральной стороны; (б, д, з, о, у, х) – вид с дорсальной стороны. I, II, IV – сегментные нервы БНЦ; an – анальное отверстие; cnp – циркумнегидиальное нервное кольцо; dpa – дпа; gl – просвет кишki; ln – латеральный нерв БНЦ; lne – окончания латерального нерва; lnp – продольные нейриты ПНС регенерата; mn – медиальный непарный нерв БНЦ; ne – нервные окончания; nf – метанефридиий; pco – пигидиальная комиссура; tn – поперечный пучок нейритов; VNC – БНЦ; звездочка – автофлуоресценция экзоэнзимных желез; пунктирная вертикальная линия – уровень ампутации; надстрочные цифры – номера регенерировавших сегментов, которым принаследуют обозначенные буквами структуры; подстрочная о в I_o , II_o , IV_o обозначает принадлежность нервов к старым тканям культи. Масштаб 50 мкм.

ся более мощными, напоминая продольные нервные стволы на заднем конце интактной БНЦ. Латеральные нервы входят в зачатки пигидиальных цирр, где обильно ветвятся (рис. 3ж, 3и). Субтерминально под эпителием будущего пигидия от латеральных нервов отходят поперечные отростки (рис. 3ж). Нейриты, направленные латерально, замыкаются на дорсальной стороне, формируя циркумпигидиальное нервное кольцо (рис. 3з). С этим кольцом связана обширная сеть ПНС, отходящая от поперечного пучка на передней дорсальной границе регенерата. В редких случаях на сроке трех дпа медиальные встречно направленные отростки продольных нервных стволов также смыкаются, давая терминальную (пигидиальную) комиссару (рис. 3и).

На стадии 4 появляются ключевые нервные элементы первого регенерированного сегмента. У четырехдневных регенераторов от продольных нервных стволов БНЦ в стороны отходят тонкие параподиальные нервы (II пара) первого формирующегося сегмента (рис. 3к). От уровня ампутации примерно до середины регенерата БНЦ обогащается комиссуральными связями. Кпереди от корешков II пары нервов вентральнее и по бокам от нейропиля БНЦ формируется плотное клеточное скопление – зачаток нового ганглия (рис. 3л, 3м). Кзади от этого зачатка БНЦ продолжается теми же отдельными нервами, что и днем ранее. У всех объектов к четвертому дпа присутствует пигидиальная комиссара, у наиболее продвинутых в передней половине БНЦ обнаруживаются дополнительные короткие латеральные отростки – формирующиеся сегментные нервы II и IV пары (рис. 3н).

В течение четвертого и пятого дпа регенерат продолжает насыщаться субэпидермальной сетью ПНС (рис. 3о, 3у). На пятый день регенерации в области ганглия первого нового сегмента заметно увеличивается ширина БНЦ (рис. 3п–3т). Возросший объем нейропиля занимает большую часть ганглия, тогда как мощность клеточного слоя по периферии остается прежней (рис. 3р, 3с). Нервы первого сегмента II и IV пары удлиняются, а параподиальные нервы утолщаются и начинают ветвиться. Иногда в задней половине регенерированной БНЦ появляется вторая пара параподиальных нервов, относящаяся к следующему сегменту (рис. 3п, 3т).

На стадии 5 происходит метамерная закладка стандартного набора нейральных структур новых сегментов. К шестому дпа можно насчитать 2–3 пары параподиальных (III) нервов, а также по 1–2 паре I и IV нервов (рис. 3ф). Комиссуральные волокна БНЦ распространяются немного дальше уровня выхода последней пары II нервов. Первый новый сегмент наиболее богат сетью ПНС. С дорсальной стороны вдоль его задней границы просматривается поперечный пучок нейритов (рис. 3х), характерный для зрелых сегментов. К восьмому дпа в сред-

нем образуется до четырех пар параподиальных нервов с отчетливым переднезадним градиентом зрелости (рис. 3ц). В местах их выхода заметны утолщения БНЦ, что напоминает строение типичного ганглия.

Динамика восстановления мышечной системы

На стадии 1 в первые сутки регенерации развиваются деструктивные процессы в мышечной системе культи. Толщина продольных мышечных лент в задней половине последнего старого сегмента заметно уменьшается, что указывает на деградацию части обрубленных волокон. Свободные концы продольных мышц примыкают к раневому эпителию (рис. 4а, 4б). Интенсивно красящиеся фаллоидином кольцевые мышцы вокруг раны сокращены, их концы на вентральной стороне близко подходят друг к другу.

На стадии 2 у двухдневных регенераторов начинается дифференцировка анального сфинктера (рис. 4в, 4г). На заднем полюсе регенерационной бластемы непосредственно под покровным эпителием фаллоидин выявляет отдельные тончайшие мышечные волокна, окружающие стенку кишki.

По ходу стадии 3 продолжается обогащение регенерата новыми мышечными волокнами (рис. 4д, 4е). К третьему дпа количество кольцевых мышц вокруг ануса увеличивается так, что они расслаиваются на два листка: внутренний примыкает к кишке, а наружный подстилает покровный эпителий. Между этими слоями образуется щелевидная полость пигидия, внутри которой лежат ядра мышечных клеток. От продольных мышц культи в бластему начинают врастать короткие мышечные пучки. На вентральной стороне они доходят до середины длины регенерата, а на дорсальной – достигают передней границы кольцевых мышц пигидия (рис. 4д, 4е).

Стадия 4 характеризуется появлением почти всех недостающих типов мышц заднего конца тела. На четвертый дпа кольцевые мышцы пигидия еще больше разрастаются вдоль переднезадней оси, в совокупности формируя анальный сфинктер конусовидной формы с узким задним концом (рис. 4ж, 4з, 4п, 4р). Внутренний слой кольцевых мышц пигидия обычно плотно сжимает заднюю кишку (рис. 4и). Полость пигидия увеличивается. Она может иметь более или менее равномерную толщину и кольцевую форму на поперечном срезе, либо несколько расширяться на дорсальной и латеральных сторонах (рис. 4к–4о). В вентральной проекции вдоль переднего более широкого конца анального сфинктера выявляются отдельные косо направленные мышечные волокна, формирующие рыхлую сеть (рис. 4ж, 4п). Граница между косыми и кольцевыми волокнами соответ-

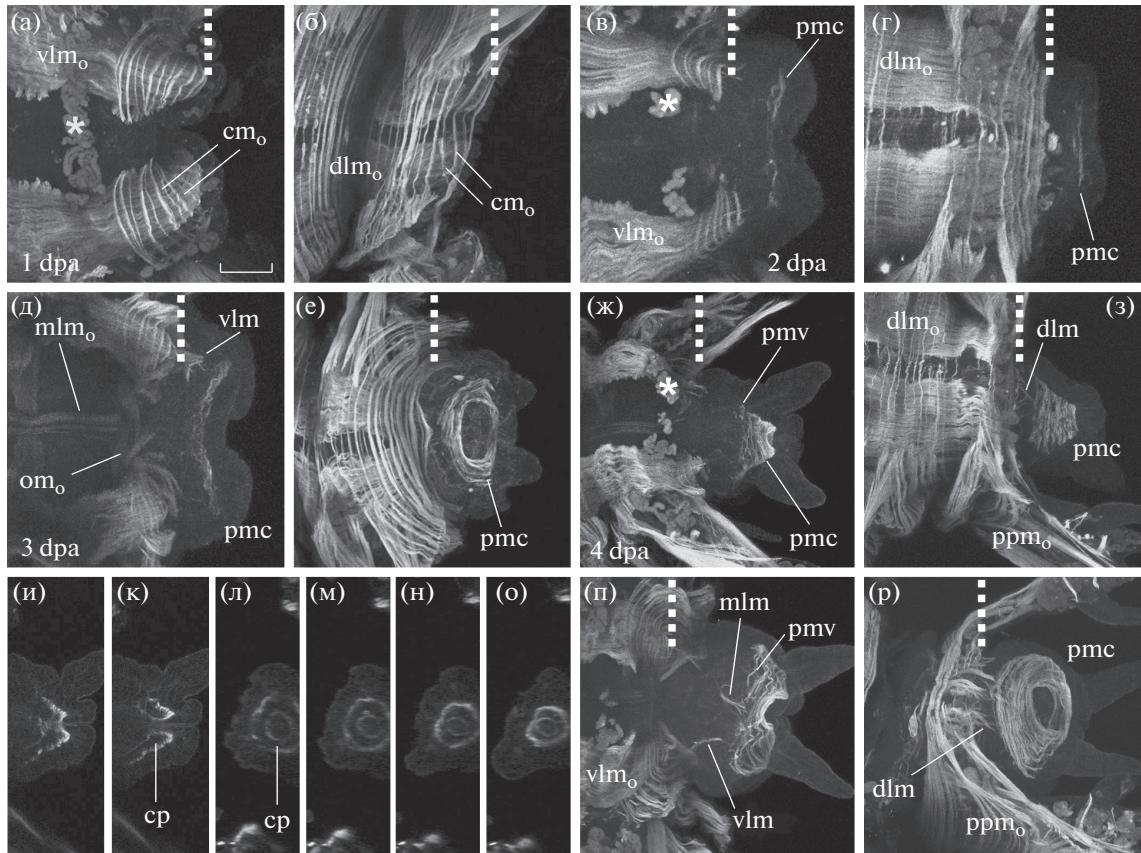


Рис. 4. Регенерация мышечной системы с 1 по 4 дпа. (а, б) – стадия 1, 1 дпа; (в, г) – стадия 2, 2 дпа; (д, е) – стадия 3, 3 дпа; (ж–р) – стадия 4, 4 дпа. Окраска мыши фаллоидином: (а–з, п, р) – максимальная проекция конфокального Z-стека; (и, к) – последовательные отдельные конфокальные снимки из Z-стека (ж); (л–о) – виртуальные поперечные срезы конфокального Z-стека (ж) на уровне пигидия (последовательность срезов идет от переднего к заднему полюсу), вентральная сторона слева. (а, б, д, ж, и, к, п) – вид с вентральной стороны; (б, г, е, з, р) – вид с дорсальной стороны. см – кольцевые мышцы;ср – полость пигидия; dlm – дорсальные продольные мышцы; дра – дпа; mlm – вентральная медиальная продольная мышца; om – косые мышцы; pmc – кольцевые мышцы пигидия; pmv – вентральная мышечная сеть пигидия; ppm – параподиальные мышцы; звездочка – автофлуоресценция экзокринных желез; пунктирная вертикальная линия – уровень ампутации; подстрочная о в см_о, dlm_о, mlm_о, om_о, ppm_о, vlm_о обозначает принадлежность мышц к старым тканям культи. Масштаб 50 мкм.

ствует уровню пигидиальной комиссуры. Спереди к сети разнонаправленных мышц пигидия примыкает новообразованный фрагмент вентральной медиальной продольной мышцы (рис. 4п). Эта мышца развивается в тесном контакте с непарным медиальным нервом БНЦ, который лежит дистальнее (ближе к вентральной стенке тела). Узкие пучки вентральных продольных мышц удлиняются вместе с регенератом, но не контактируют с мышцами пигидия (рис. 4п). Напротив, на дорсальной стороне продольные мышцы остаются связанными с анальным сфинктером на этой и последующих стадиях. На передней границе регенерата появляются билатерально симметричные пучки косых мышц, направленные от БНЦ дорсолатерально (рис. 4п).

На сроке пять дпа плотность вентральной сети и кольцевых мышц пигидия возрастает (рис. 5а, 5б). Вентральная медиальная продольная мышца состо-

ит из двух параллельных близко лежащих пучков. Спереди они достигают уровня ампутации и соединяются с соответствующими волокнами культи. В области первой межсегментной борозды регенерата от вентральной медиальной продольной мышцы дорсолатерально отходит два новых пучка косых мышц: тонкий пучок на заднем конце первого сегмента и более мощный пучок на переднем конце второго сегмента (рис. 5а). Вентральные продольные мышцы залегают ближе к поверхности тела по бокам от БНЦ и заходят каудальнее первой борозды. Наиболее длинные волокна этих продольных мышц лежат латерально, тогда как более короткие медиальные пучки оканчиваются в пределах первого регенерированного сегмента (рис. 5а). Дополнительные тончайшие волокна соединяют места входа вентральных продольных мышц в регенерат с вентромедиальной точкой у границы пигидия, где оканчивается вентральная

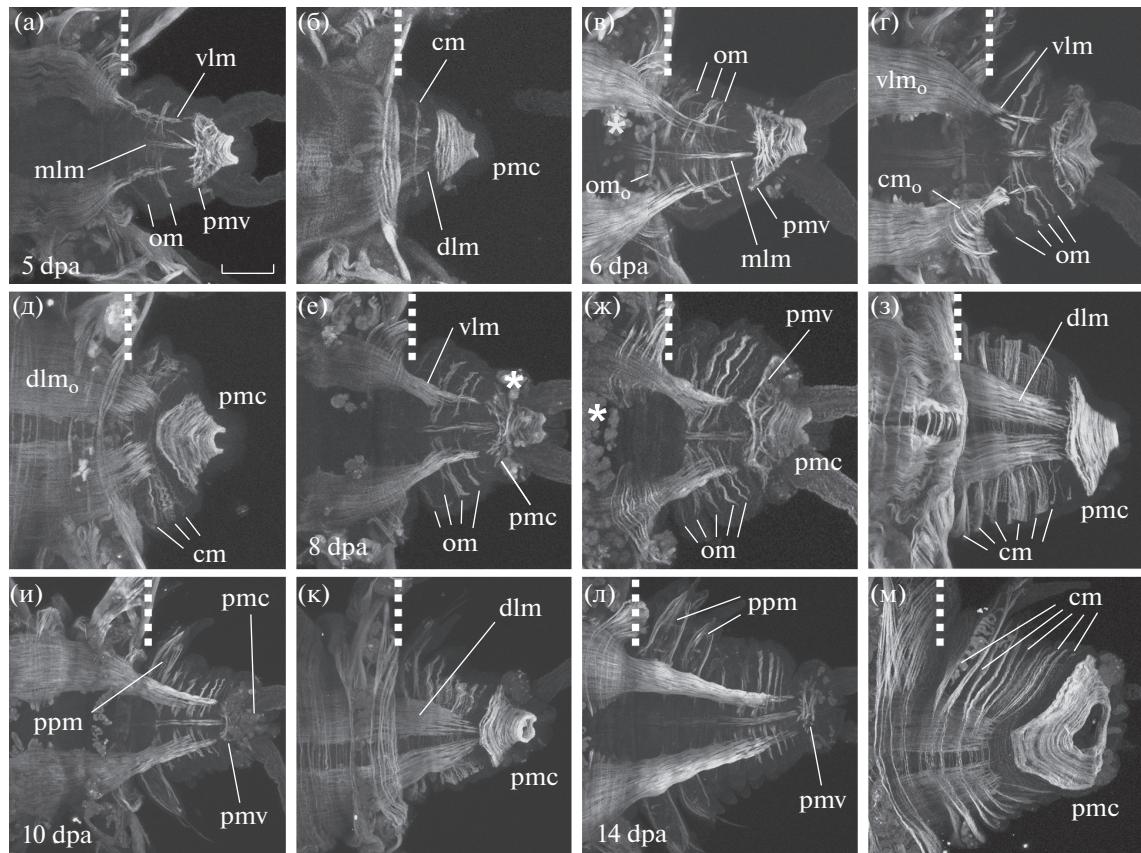


Рис. 5. Регенерация мышечной системы с 5 по 14 дпа. (а, б) – стадия 4, 5 дпа; (в–к) – стадия 5; (в–д) – 6 дпа; (е–з) – 8 дпа; (и, к) – 10 дпа; (л, м) – нормальный постларвальный рост, 14 дпа. Окраска мышц фаллоидином, максимальная проекция конфокального Z-стека. (а, в, г, е, ж, и, л) – вид с вентральной стороны; (б, д, з, к, м) – вид с дорсальной стороны. см – кольцевые мышцы; dlm – дорсальные продольные мышцы; дра – дпа; mlm – вентральная медиальная продольная мышца; om – косые мышцы; pmc – кольцевые мышцы пигидия; pmv – вентральная мышечная сеть пигидия; ppm – параподиальные мышцы; звездочка – автофлуоресценция экзокринных желез; пунктирная вертикальная линия – уровень ампутации; подстрочная о в см_о, dlm_о, om_о, vlm_о обозначает принадлежность мышц к старым тканям культи. Масштаб в (а–з) 50 мкм, в (и–м) 30 мкм.

медиальная продольная мышца. На дорсальной стороне вблизи задней границы первого сегмента появляется пучок кольцевых мышц (рис. 5б).

На стадии 5 завершается формирование всех основных мышечных элементов первого восстановленного сегмента, и последовательно появляются мышцы последующих метамеров. К шестому дпа структура мышц пигидия остается прежней. Вентральные продольные мышцы конусовидно сужаются кзади и заходят за границу второго нового сегмента (рис. 5в, 5г). На уровне межсегментных борозд регенерата выявляется 4–5 пар пучков косых мышц. У первых двух сегментов косые мышцы лежат и на передней и на задней границе, а иногда встречается еще одна пара пучков на задней границе следующего (третьего) формирующегося метамера (рис. 5в, 5г). На дорсальной стороне хорошо видно несколько пучков кольцевых мышц, распространяющихся в редких случаях кзади от второго сегмента (рис. 5д).

К восьмому дпа в регенерате развивается 6–7 пар пучков косых мышц и 7–8 кольцевых мышц (рис. 5е–5з). Эти мышцы маркируют границы примерно четырех обособленных бороздами сегментов, а иногда выявляются и каудальнее. В вентральной проекции анальный сфинктер приобретает форму короткого цилиндра (рис. 5е, ж). Спереди к нему примыкает широкий короткий участок косых и продольно направленных волокон. На десятый дпа в сумме до 12-ти косых и кольцевых мышц лежат на границах шести метамеров. В первом регенерировавшем сегменте под вентральными продольными мышцами и в толще зачатков параподий развиваются мышцы параподиального комплекса (рис. 5и, 5к). Продольные мышечные ленты становятся все более широкими. У двухнедельных регенераторов косые и кольцевые мышцы ограничиваю до девяти метамеров (рис. 5л, 5м). Параподиальные мышцы отсутствуют в наиболее молодых (задних) 4–6 метамерах. Кольцевые мышцы пигидия просматриваются

ЭПИМОРФОЗ

МОРФАЛЛАКСИС

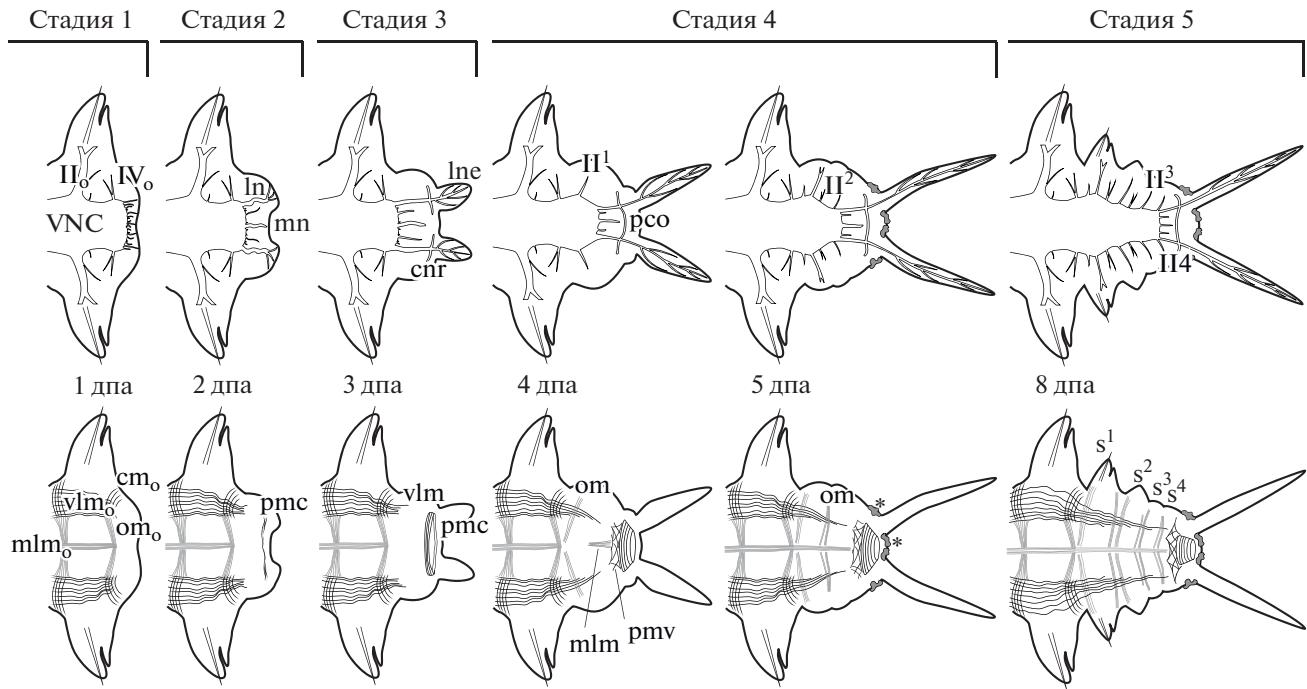


Рис. 6. Схематичное изображение процесса регенерации. Последовательность стадий регенерации расположена слева направо. Полосы с градиентной заливкой отражают временную приуроченность и относительную интенсивность эпиморфных и морфаллактических процессов. Верхний ряд контуров – восстановление нервной системы, нижний ряд – развитие мышц; вид с центральной стороны. см – кольцевые мышцы; спг – циркумпигидиальное нервное кольцо; ln – латеральный нерв БНЦ; lne – окончания латерального нерва; vlm – вентральная медиальная продольная мышца; mn – медиальный непарный нерв БНЦ; om – косые мышцы; рсо – пигидиальная комиссура; ртс – кольцевые мышцы пигидия; ртм – вентральная мышечная сеть пигидия; s – сегменты, ограниченные внешними бороздами; VNC – БНЦ; звездочка – экзокринные железы; надстрочные цифры – номера регенерировавших сегментов, которым принадлежат обозначенные буквами структуры; подстрочная о в Π_0 , IV_0 , cm_0 , dlm_0 , mlm_0 , om_0 , vlm_0 обозначает принадлежность структур к старым тканям культуры.

лишь с дорсальной стороны, куда открывается анус. Вентральная сеть разнонаправленных волокон пигидия оказывается приближенной к основанию пигидиальных цирр (рис. 5л). Регенерат отличим от интактного заднего конца тела лишь размерами и перепадом в ширине вентральных продольных мышц.

ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе посттравматической регенерации полихета *A. virrens* демонстрирует полноценное восстановление всех анатомических структур заднего конца тела. Первыми (на стадиях 1–3) появляются терминалные структуры: мышцы анального сфинктера, полость пигидия, циркумпигидиальное нервное кольцо, пигидиальные цирры (рис. 6). Со стадии 3 за счет восстановленной зоны роста и активной пролиферации (Kozin, Kostyuchenko,

2015) кпереди от пигидия закладываются новые сегменты. К четвертому дпа появляются зачатки ганглия БНЦ, нервов и мышц первого сегмента. Дифференцировка этого сегмента теснейшим образом связана как с эпиморфными процессами внутри регенерационной почки, так и с перестройкой старых тканей последнего сегмента (т.е. морфалактическими явлениями). Ганглий первого восстанавливаемого сегмента частично сохраняется после операции, так что его воссоздание существенно отличается. Волокна продольных мышц, которые в норме простираются на длину более одного сегмента, должны восстанавливаться одновременно и в последнем старом и в первом новом сегменте. Образование последующих новых сегментов больше напоминает ускоренный постларвальный рост.

Важнейшие этапы задней регенерации *A. virens* – заживление раны, формирование и

дифференциация бластемы с последующей последовательной сегментацией – консервативны для аннелид. Сравнение длительности этих этапов у видов с разработанной системой стадирования (Myohara, 2004; Zattara, Bely, 2011; Jong, Seaver, 2016) позволяет выявить три основные параметра, ответственные за скорость процесса. Во-первых, определяющее влияние на метаболизм имеет температура. Подопытных червей обычно культивируют при 10–25°C. Использование температурных условий на границах этого диапазона может изменять длительность регенерации на порядок. Во-вторых, немаловажным фактором является размер (и обычно коррелирующий с ним возраст) животного. Крупные экземпляры чаще демонстрируют более длительные ранние стадии заживления раны и формирования бластемы. Наконец, большое значение имеют видоспецифичные особенности механизмов регенерации, связанные в т.ч. со способом ампутации, и физиологическое состояние особи. Тщательный контроль первых двух параметров позволил минимизировать естественную вариабельность. Использованные нами условия экспериментов на *A. virens* выглядят удобными и оптимальными для получения стандартного результата.

Каких-либо морфологических изменений в старых сегментах *A. virens*, кроме последнего, отмечено не было. Это свидетельствует о преимущественно эпиморфном характере восстановления нервной и мышечной системы. Тем не менее, изначально (стадии 1–3) нервные элементы регенерата образуются за счет нейритов из старых сегментов (рис. 6). Иннервация регенерационной почки продольными отростками из БНЦ типична для аннелид (Herlant-Meewis, 1964; Короткова, 1997; Özpolat, Bely, 2016). Для многих видов описано формирование нервной петли, соединяющей эти отростки. Сходным образом у *A. virens* на стадии 3–4 появляются циркумпигидиальное нервное кольцо и пигидиальная комиссуря (рис. 6). Гораздо реже у аннелид отмечена иннервация регенерата со стороны ПНС. У *A. virens* нейриты ПНС, идущие из старых тканей, выявляются в ране уже в первые сутки регенерации (рис. 3). Еще до появления из БНЦ сегментных нервов происходит активное обогащение регенерата субэпителиальной сетью ПНС. Учитывая таксономическое разнообразие аннелид с всесторонней иннервацией регенерата (*A. virens*, седентарная полихета *Capitella teleta*, водные и почвенные олигохеты), вероятной представляется неполнота результатов, указывающих только на нейриты из БНЦ у остальных исследованных видов.

Полученные нами данные о раннем появлении нейритов, идущих от БНЦ и ПНС сквозь раневой эпителий к поверхности тела, заставляют по-новому оценить восстановление нервной системы аннелид. В работах по отведению БНЦ от места ампутации наблюдалась аномальная регенерация,

иногда ограниченная лишь заживлением раны (Herlant-Meewis, 1964; Combaz, Boilly, 1974; Müller et al., 2003). Полноценная регенерация была возможна, только если нервные отростки достигали регенерата. Был сделан вывод, что нейриты должны взаимодействовать с бластемой для ее роста и дифференцировки. Мы обнаружили, что у *A. virens* первоначально восстанавливаются нервные окончания на поверхности раны. Скорее всего, это заывает для БНЦ новые границы тела уже на стадии 1, что подтверждается данными по перестройке паттернов экспрессии *Nox* генов в старых сегментах в первые сутки после ампутации (Novikova et al., 2013). Дальнейший рост бластемы, отмеченный у нереид и в отсутствие БНЦ, сопровождается удлинением продольных нервных отростков. Таким образом, БНЦ совсем необязательно напрямую выполняет “трофическую и организующую функцию”, как постулировалось ранее (Combaz, Boilly, 1974). Более вероятной мы считаем роль нервной системы в обеспечении глобального паттерна вдоль переднезадней оси.

Нами впервые наглядно показано, что у полихет опережающими темпами развиваются нервные элементы регенерата по сравнению с окружающими их мышцами (рис. 6). Непарный медиальный нерв выявляется уже на стадии 2, тогда как прилежащая к нему вентральная медиальная продольная мышца появляется лишь на стадии 4. Ганглий и нервы, отходящие от БНЦ в первом новом сегменте, отмечены уже на четвертый дпа, косые мышцы отделяют первый сегмент на следующий день, а мышцы параподиального комплекса образуются здесь только к десятому дпа. Похожим образом развитие нервной системы предшествует дифференцировке мышц в последующих сегментах. В ходе эмбриогенеза нереидных полихет обе дефинитивные системы тела формируются параллельно (Fischer et al., 2010), хотя еще до их появления развиваются пионерные нейроны ПНС, выполняющие роль остова для дифференцировки ЦНС (Воронежская, Ивашкин, 2010). Объяснением гетерохронии регенерационных морфогенезов мы считаем различные клеточные источники нервных и мышечных структур. Если первые развиваются на основе нервных отростков из старых тканей, то вторые по большей части образуются из недифференцированных клеток бластемы.

По нашим данным все мышечные волокна регенерационной почки, за исключением продольных мышц, формируются вне связи со старой мускулатурой. Известно, что мезодермальные производные берут начало от бластемных масс, варьирующих по происхождению у разных видов (Boilly, 1969; Bely, 2014; Костюченко и др., 2016). Врастание продольных мышечных пучков из старого сегмента характерно для аннелид и иногда трактуется в пользу возможного независимого

клеточного источника продольной и кольцевой мускулатуры (Zattara, Bely, 2011; Weidhase et al., 2014). Подобные предположения являются перспективными для проверки на *A. virens*. Благодаря сделанным нами описаниям решения этого вопроса и многих других актуальных проблем морфогенезов и дифференцировки клеток в ходе регенерации стало более доступным при использовании нереидных полихет в качестве модельных объектов.

Исследования проведены при финансовой поддержке гранта СПбГУ 1.38.209.2014 и РФФИ 16-04-00991-а с использованием оборудования РЦ РМиКТ СПбГУ и инфраструктуры МБС СПбГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронежская Е.Е., Ивашин Е.Г.** Пионерные нейроны: основа или ограничивающий фактор разнообразия нервных систем Lophotrochozoa? // Онтогенез. 2010. Т. 41. № 6. С. 403–413.
- Дондуа А.К.** Влияние актиномицина Д и сибиromицина на эмбриональное и личиночное развитие *Nereis virens* (Sars.) // Онтогенез. 1975. Т. 6. № 5. С. 475–484.
- Короткова Г.П.** Регенерация животных. СПб: Изд-во С-Петербургского ун-та, 1997. 479 с.
- Костюченко Р.П., Козин В.В., Куприяшова Е.Е.** Регенерация и бесполое размножение у аннелид: клетки, гены и эволюция // Изв. РАН. Сер. Биол. 2016. № 3. С. 231–241.
- Старунов В.В., Лаврова О.Б.** Строение нервной системы и мускулатуры пигидия у полихеты *Alitta virens* (Nereididae) // ДАН. 2013. Т. 451. № 3. С. 355–357.
- Backfisch B., Kozin V.V., Kirchmaier S., Tessmar-Raible K., Raible F.** Tools for gene-regulatory analyses in the marine annelid *Platynereis dumerilii* // PLoS One. 2014. V. 9. № 4. P. e93076.
- Bely A.E.** Distribution of segment regeneration ability in the Annelida // Integr. Comp. Biol. 2006. V. 46. № 4. P. 508–518.
- Bely A.E.** Early events in annelid regeneration: A cellular perspective // Integr. Comp. Biol. 2014. V. 54. № 4. P. 688–699.
- Boilly B.** Sur l'origine des cellules régénératrices chez les annélides polychètes // Arch. Zool. Exp. Gen. 1969. V. 110. P. 125–144.
- Combaz A., Boilly B.** Étude expérimentale et histologique de la régénération caudale en l'absence de chaîne nerveuse chez les Nereidae (Annélides Polychètes) // Ann. Embryol. Morphog. 1974. V. 7. P. 171–197.
- de Jong D.M., Seaver E.C.** A stable thoracic Hox code and epimorphosis characterize posterior regeneration in *Capitella teleta* // PLoS One. 2016. V. 11. № 2. P. e0149724.
- Dorresteijn A.** Cell lineage and gene expression in the development of polychaetes // Hydrobiologia. 2005. V. 535–536. № 1. P. 1–22.
- Fischer A.** Reproductive and developmental phenomena in annelids: a source of exemplary research problems // Hydrobiologia. 1999. V. 402. P. 1–20.
- Fischer A.H., Henrich T., Arendt D.** The normal development of *Platynereis dumerilii* (Nereididae, Annelida) // Front. Zool. 2010. V. 7. № 1. P. 31.
- Fontés M., Coulon J., Delgross M.-H., Thouveny Y.** Muscle dedifferentiation and contractile protein synthesis during post-traumatic regeneration by *Owenia fusiformis* (polychaete annelid) // Cell Differentiation. 1983. V. 13. № 4. P. 267–282.
- Golding D.W.** Endocrinology, regeneration and maturation in *Nereis* // Biol. Bull. 1967. V. 133. № 3. P. 567–577.
- Hamaker J.I.** The nervous system of *Nereis virens* Sars. A study in comparative neurology // Bull. Mus. Comp. Zool. Harv. 1898. V. 32. P. 89–124.
- Herlant-Meewis H.** Regeneration in annelids // Adv. Morphog. 1964. V. 4. P. 155–215.
- Hyman L.H.** Aspects of regeneration in annelids // The American Naturalist. 1940. V. 74. № 755. P. 513–527.
- Kozin V.V., Filimonova D.A., Kupriashova E.E., Kostyuchenko R.P.** Mesoderm patterning and morphogenesis in the polychaete *Alitta virens* (Spiralia, Annelida): Expression of mesodermal markers Twist, Mox, Evx and functional role for MAP kinase signaling // Mech. Dev. 2016. V. 140. P. 1–11.
- Kozin V.V., Kostyuchenko R.P.** Vasa, PL10, and Piwi gene expression during caudal regeneration of the polychaete annelid *Alitta virens* // Dev. Genes Evol. 2015. V. 225. № 3. P. 129–138.
- Mettam C.** Segmental musculature and parapodial movement of *Nereis diversicolor* and *Nephthys hombergi* (Annelida: Polychaeta) // J. Zoology. 1967. V. 153. № 2. P. 245–275.
- Müller M.C.M., Berenzen A., Westheide W.** Experiments on anterior regeneration in *Eurythoe complanata* ("Polychaeta", Amphinomidae): reconfiguration of the nervous system and its function for regeneration // Zoomorphology. 2003. V. 122. № 2. P. 95–103.
- Müller M.C.M., Henning L.** Ground plan of the polychaete brain. I. Patterns of nerve development during regeneration in *Dorvillea bermudensis* (Dorvilleidae) // J. Comp. Neurol. 2004. V. 471. № 1. P. 49–58.
- Myohara M.** Differential tissue development during embryogenesis and regeneration in an annelid // Dev. Dyn. 2004. V. 231. № 2. P. 349–358.
- Novikova E.L., Bakalenko N.I., Nesterenko A.Y., Kulakova M.A.** Expression of Hox genes during regeneration of nereid polychaete *Alitta* (*Nereis*) *virens* (Annelida, Lophotrochozoa) // EvoDevo. 2013. V. 4. № 1. P. 14.
- Özpolat B.D., Bely A.E.** Developmental and molecular biology of annelid regeneration: a comparative review of recent studies // Curr. Opin. Genetics Dev. 2016. V. 40. P. 144–153.
- Pfeifer K., Dorresteijn A.W.C., Fröbius A.C.** Activation of Hox genes during caudal regeneration of the polychaete annelid *Platynereis dumerilii* // Dev. Genes Evol. 2012. V. 222. № 3. P. 165–179.
- Sato K., Chernoff E.A.G.** The short toes mutation of the axolotl // Dev. Growth Differ. 2007. V. 49. № 6. P. 469–478.
- Smith J.E.** The nervous anatomy of the body segments of nereid polychaetes // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1957. V. 240. № 671. P. 135–196.

Storch V. Zur vergleichenden anatomie der segmentalen muskelsysteme und zur verwandtschaft der polychaeten-familien // Z. Morph. Tiere. 1968. V. 63. № 3. P. 251–342.

Weidhase M., Bleidorn C., Helm C. Structure and anterior regeneration of musculature and nervous system in *Cirratulus cf. cirratus* (Cirratulidae, Annelida) // J. Morphol. 2014. V. 275. № 12. P. 1418–1430.

Witchley J.N., Mayer M., Wagner D.E., Owen J.H., Reddien P.W. Muscle cells provide instructions for planarian regeneration // Cell Reports. 2013. V. 4. № 4. P. 633–641.

Zattara E.E., Bely A.E. Evolution of a novel developmental trajectory: fission is distinct from regeneration in the annelid *Pristina leidyi* // Evol. Dev. 2011. V. 13. № 1. P. 80–95.

Regeneration of the Nervous and Muscular System after Caudal Amputation in the Polychaete *Alitta virens* (Annelida: Nereididae)

V. V. Kozin, N. A. Filippova, and R. P. Kostyuchenko*

Department of Embryology, Saint-Petersburg State University Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia

*e-mail: r.kostyuchenko@spbu.ru

Received October 1, 2016

Regenerating segments in polychaetes offer a vivid example of epimorphic recovery of the lost organs and tissues. It is also a promising object for studying positional information and the mechanisms maintaining the body integrity. With the aim to develop a convenient standardized model, we described the dynamics of recovery of the major anatomical structures and created a staging system for the caudal regeneration in *Alitta virens*. In average the normal organization of the posterior body end is restored within 10 days after amputation (dpa). The whole regenerative process was divided into 5 stages: (1) wound healing (0–1 dpa), (2) blastema formation (1–2 dpa), (3) patterning and growth of the blastema (2–3 dpa), (4) differentiation of the first regenerated segment (3–5 dpa), (5) formation and differentiation of the subsequent 5–6 segments (5–10 dpa). The regeneration is carried out mainly by epimorphosis, although the elements of intercalary growth as well as the morphallactic transformation of the stump have been noted. Terminal structures of the pygidium (muscles of the anal sphincter, pygidial cavity, pygidial ring nerve, pygidial cirri) appear at stages 1–3, and then (from stage 3) the formation of new metameres begins in front of the pygidium. Differentiation of the first newborn segment is associated with the tissue remodeling in the last old segment. Formation of the next segments resembles accelerated postlarval growth. The neural elements of the regenerative bud are developing faster than the surrounding muscles. The neurites extending from the CNS and PNS come to the surface of the wound epithelium at stage 1. Later, nerve fibers from the CNS lengthen and thicken along with the growth of the regenerative bud. Ganglion, parapodial nerves, oblique muscles and coeloms of the first segment are detected at stage 4. Longitudinal muscles regenerate in anterior to posterior progression, being constantly in contact with the corresponding fibers of the old tissues. All other muscles differentiate from blastemal cells in isolation from the old musculature of the stump. Our data promote the further using of the posterior body end regeneration in *A. virens* as an experimental model for resolving crucial problems of developmental biology.

Keywords: regeneration, reparative morphogenesis, cell differentiation, neurogenesis, ventral nerve cord, body wall muscles, acetylated α -tubulin, phalloidin, confocal microscopy, *Nereis*, Polychaeta, Spiralia, Lophotrochozoa