

УДК 593.4, 576.7

КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ ИЗВЕСТКОВОЙ ГУБКИ
LEUCOSOLENIA VARIABILIS

CELLULAR MECHANISMS OF REGENERATION IN CALCAREOUS SPONGE
LEUCOSOLENIA VARIABILIS

**Лавров А.И.¹, Скоренцева К.В.², Саидов Д.М.³, Большаков Ф.В.¹, Мельников Н.П.⁴,
Саидова А.А.², Ересковский А.В.^{5,6,7}**

¹ Беломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова, Биологический факультет,
Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Кафедра клеточной биологии и гистологии, Биологический факультет, Московский
Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Кафедра общей экологии и гидробиологии, Биологический факультет, Московский
Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Кафедра зоологии беспозвоночных, Биологический факультет, Московский
Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Средиземноморский институт биоразнообразия и экологии, ИЦНИ, Университет Экс-
Марсель, Франция

⁶ Кафедра эмбриологии, Биологический факультет, Санкт-Петербургский
Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

⁷ Лаборатория эволюции морфогенезов, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
РАН, Москва, Россия

**Lavrov A.I.¹, Skorentseva K.V.², Bolshakov F.V.¹, Saidov D.M.³, Melnikov N.P.⁴, Saidova
A.A.², Ereskovsky A.V.^{5,6,7}**

¹ Pertsov White Sea Biological Station, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State
University, Moscow, Russia

² Department of Cell Biology and Histology, Biological faculty, Lomonosov Moscow State
University, Moscow, Russia

³ Department of General Ecology and Hydrobiology, Biological faculty, Lomonosov Moscow
State University, Moscow, Russia

⁴ Department of Invertebrate Zoology, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University,
Moscow, Russia

⁵ Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE), Aix
Marseille University, CNRS, IRD, Avignon University, Station Marine d'Endoume, Marseille,
France

⁶ Department of Embryology, Biological faculty, Saint-Petersburg State University, Saint-
Petersburg, Russia

⁷ Laboratory of Evolutionary Morphogenesis, Koltzov Institute of Developmental Biology of
RAS, Moscow, Russia

Введение

Губки (тип Porifera) представляют собой базальную ветвь многоклеточных животных, для которых характерно своеобразное анатомическое и гистологическое строение (Ereskovsky, Lavrov, 2021). Эти животные демонстрируют значительный регенеративный потенциал и способны восстанавливать исходную организацию после различных типов

повреждений. Центральным процессом в регенерации известковых губок (кл. *Calcarea*) является быстрое формирование регенеративной мембраны, которая закрывает рану, а затем преобразуется в интактную стенку тела (Ereskovsky et al., 2021). Целью данной работы было оценить вклад клеточной пролиферации, программируемой клеточной гибели и клеточной подвижности в процесс регенерации стенки тела известковой асконоидной губки *Leucosolenia variabilis*.

Материалы и методы

Сбор особей *Leucosolenia variabilis* проводили в окрестностях Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова (66°34' N, 33°08' E) с верхней сублиторали во время отлива с мая по сентябрь 2018-2021 г. Были исследованы процессы регенерации после 2 типов операций: 1) удаление небольшого (0,3-0,5 мм x 0,3-0,5 мм) фрагмента стенки тела в проксимальной части оскулярных трубок; 2) разрезание оскулярной трубки перпендикулярно основной оси на кольца шириной 2-4 мм. После операции губки и кольца содержались в чашках Петри с 5 мл стерильной морской воды (СМВ) при температуре 8-14°C. Каждые 24 часа проводили полную смену СМВ в чашках.

Структуру систем актиновых филаментов и микротрубочек в клетках интактных тканей и регенеративной мембраны (РМ) визуализировали иммуноцитохимическим методом с использованием антител против β -актина и α -тубулина. Образцы исследовали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (КЛСМ) Nikon A1. Морфологию клеток интактных тканей и РМ описывали с использованием 3 параметров: площадь, циркулярность и AR (соотношение осей) (данные приведены как среднее \pm стандартная ошибка). Статистический анализ проводился с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни ($p < 0.05$) или теста множественных сравнений Данна ($p < 0.05$).

Для оценки интенсивности пролиферации в ходе регенеративных процессов использовали 5-этинил-2'-дезоксинуридин (EdU) (6 ч инкубации в 20 мкМ EdU) и антитела против фосфорилированного гистона H3 (pH3). Пролиферация клеток была исследована в интактных тканях губки и 7 временных точках регенерации стенки тела: 0-6 часов после операции (чпо), 6-12 чпо, 12-18 чпо, 18-24 чпо, 48-54 чпо, 66-72 чпо и 96-102 чпо. В каждой временной точке было исследовано 3-5 особей. Образца изучали на Z-стэках, полученных на КЛСМ Nikon A1: 3 непересекающихся Z-стэка тканей, прилежащих к ране (ранеая область), и 3 непересекающихся Z-стэка тканей, удаленных от раны (интактная область). Полученные Z-стэки анализировали с помощью ПО FiJi ImageJ v.1.52i и Bitplane Imaris 7.2.1. Интенсивность пролиферации оценивалась как доля EdU-положительных ядер к общему числу ядер (данные приведены как среднее \pm стандартное отклонение). Для определения значимости различий долей пролиферирующих клеток в раневой и интактной областях использовали критерий согласия Пирсона ($p < 0.05$).

Для оценки вклада клеточной пролиферации в процессы регенерации стенки тела были проведены эксперименты по блокировке пролиферации.. Перед операцией губок помещали в 5 мл СМВ с 1 мкг/мл афидиколина на 12 часов. Затем у губок удаляли фрагмент стенки тела и наблюдали за процессом регенерации. Каждые 24 часа проводили полную смену среды в чашках. Концентрация афидиколина оставалась постоянной в течение всего процесса регенерации. В качестве контроля использовали губок, инкубированных в СМВ с диметилсульфоксидом (ДМСО). Всего в эксперименте была использована 61 особь.

Для оценки интенсивности программированной клеточной гибели (ПКГ) в ходе регенеративных процессов использовали метод визуализации апоптотических клеток TUNEL. Апоптоз был изучен в интактных тканях губки и на 5 стадиях регенерации стенки

тела: 3 чпо, 6 чпо, растущая РМ (12-30 чпо), полная РМ (22-44 чпо), преобразование РМ в интактную стенку тела (56-76 чпо). На каждой стадии было исследовано 4-5 особей, у каждого образца была исследована раневая и интактные области на КЛСМ Nikon A1.

Результаты

Процесс регенерации *Leucosolenia variabilis* проходит сходным образом после обоих типов хирургических операций. Раневые отверстия в течении 24-48 чпо закрываются регенеративной мембраной (РМ). РМ состоит из трех слоев: экзопинакодермы, эндопинакодермы, формирующейся за счет трансдифференцировки хоаноцитов, и разделяющего их тонкого слоя мезохила, в котором почти отсутствуют клетки (Lavrov et al., 2018). К 144-168 чпо происходит преобразование РМ в интактную стенку тела: эндопинакодерма замещается хоанодермой; пороциты формируют новые остии; мезохил утолщается, в нем появляются амебоидные клетки и скелетные элементы. После удаления фрагмента стенки тела РМ и новая стенка формируются на месте раневого отверстия. При регенерации колец РМ и новые стенки тела формируются на торцевых сторонах колец.

В процессе формирования РМ и ее последующего преобразования в интактную стенку тела происходят перестройки цитоскелета клеток, участвующих в процессе регенерации, а также изменения морфологических параметров этих клеток. Цитоплазматические пластинки интактных Т-образных экзопинакоцитов, формирующие наружную поверхность интактной стенки тела, имеют площадь 199.6 ± 5.188 мкм² (n=266), циркулярность 0.6745 ± 0.006 (n=268) и AR 1.514 ± 0.0186 (n=256). При формировании РМ происходит уплощение экзопинакоцитов, их площадь и циркулярность значительно изменяются до 231.2 ± 6.367 мкм² (n=196; p=0.0001) и 0.6286 ± 0.0081 (n=196; p<0.0001), соответственно. Значимых изменений AR не происходит. Интактные хоаноциты представляют собой призматические клетки с площадью 29.74 ± 0.5146 мкм² (n=131), циркулярностью 0.9071 ± 0.0042 (n=131) и AR 1.177 ± 0.0083 (n=129). При формировании РМ хоаноциты трансдифференцируются в эндопинакоциты, уплощаясь и теряя жгутик и воротничок микроворсинок. При трансдифференцировке хоаноцитов происходят значимые изменения всех морфологических параметров клетки: площадь возрастает до 89.63 ± 7.535 мкм² (n=50; p<0.0001), циркулярность снижается до 0.6499 ± 0.0189 (n=52; p<0.0001), AR повышается до 1.56 ± 0.0493 (n=51; p<0.0001).

Для интактных тканей *L. variabilis* характерен высокий уровень пролиферативной активности: в них постоянно присутствуют как EdU-, так и pH3-положительные клетки. Абсолютное большинство пролиферирующих клеток является хоаноцитами; изредка встречаются пролиферирующие клетки вне хоанодермы, принадлежащие мезохилу или экзопинакодерме. В проксимальной части оскулярной трубки у интактных губок присутствует $9.76 \pm 1.91\%$ EdU-положительных клеток. Регенерирующие губки сохраняют описанный паттерн пролиферации во всех исследованных временных точках как в раневой, так и интактной области. При этом в раневых областях во всех временных точках регенерации пролиферирующие клетки присутствуют только в интактных тканях, непосредственно прилегающих к ране, и практически не встречаются в растущей и сформированной РМ. Вероятно, в области РМ пролиферирующие клетки начинают появляться в ходе преобразования РМ в интактную стенку тела (66-72 и 96-102 чпо), когда на ее внутренней стороне происходит редифференцировка хоаноцитов. Однако на этой стадии становится невозможным провести четкие границы между интактными тканями, непосредственно прилежащими к ране, и трансформирующейся РМ. Хотя регенерирующие губки демонстрируют значительную индивидуальную изменчивость в уровне пролиферации (от 2,6% до 20,73% EdU-положительных клеток), как правило пролиферация в раневой

области регенерирующей губки оказывается сниженной по сравнению с интактной областью той же особи во всех исследованных временных точках. В большинстве случаев эти различия не являются статистически достоверными. Эксперименты по блокировке пролиферации в ходе регенерации стенки тела показали, что полное восстановление утраченного фрагмента может нормально проходить при полном отсутствии клеточных делений. При этом процесс регенерации у губок с заблокированной пролиферацией (n=32) и контрольных губок (n=29) происходит с одинаковой скоростью.

Апоптоз происходит на всех стадиях регенерации стенки тела *L. variabilis*, однако его уровень очень низок. Количество апоптотических клеток несколько выше на ранних стадиях регенерации (3 чпо, 6 чпо, растущая РМ), когда удается обнаружить несколько меченых клеток в одном поле зрения. На более поздних стадиях (полная РМ и ее преобразование в стенку тела) уровень апоптоза падает, и удается обнаружить единичные апоптотические клетки на 3-4 поля зрения. Пространственное распределение апоптотических клеток в теле губки неравномерно – на всех стадиях они находятся непосредственно на краю раны. В тканях, удаленных от раны, такие клетки встречаются крайне редко.

Заключение

Полученные нами данные указывают, что ни клеточная пролиферация, ни ПКГ не играют значительной роли в регенеративных процессах у асконоидной известковой губки *Leucosolenia variabilis*. Постоянная клеточная пролиферация у регенерирующих губок, вероятно, связана с физиологическими процессами (поддержание тканевого гомеостаза, обновление хоанодермы), а не с самим процессом регенерации: в раневой области не наблюдается повышения уровня пролиферации; полная блокировка пролиферации не влияет на скорость и эффективность регенерации.

В ходе регенерации также не наблюдается появления значительного количества апоптотических клеток. Небольшое повышение апоптотической активности происходит лишь на ранних этапах процесса, что, вероятно, связано с элиминацией клеток, повреждённых в ходе хирургической операции.

Основной движущей силой регенерации у *L. variabilis*, судя по всему, является коллективное изменение формы и миграция клеток в составе хоанодермы и экзопинакодермы, на что указывают значительные изменения морфологических параметров этих клеток в ходе процесса регенерации.

Таким образом, регенерация *L. variabilis* происходит только за счет перестройки интактных тканей, прилежащих к ране, и представляет собой редкий пример «чистого» морфоллаксиса.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-04-00563 и грантом Президента РФ МК-1096.2021.1.4.

Список литературы

Ereskovsky A.V., Borisenko I.E., Bolshakov F.V., Lavrov A.I. Whole-Body Regeneration in Sponges: Diversity, Fine Mechanisms, and Future Prospects // *Genes* – 2021. – V. 12. – 506.

Ereskovsky A.V., Lavrov A.I. Porifera. in: LaDouceur, E.B. (Ed.), *Invertebrate Histology* – 2021. – P. 19–54.

Lavrov A.I., Bolshakov F.V., Tokina D.B., Ereskovsky A.V. Sewing up the wounds: The epithelial morphogenesis as a central mechanism of calcaronean sponge regeneration // *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* – 2018. – V. 330. – P. 351–371.




X Международная научно-практическая конференция

«Морские исследования и образование»

**X International conference
«Marine Research and Education»**

MARESEDU-2021



**ТРУДЫ КОНФЕРЕНЦИИ / CONFERENCE
PROCEEDINGS
Том II(III) / Volume II(III)**

25-29 октября 2021г.

УДК [551.46+574.5](063)

ББК 26.221я431+26.38я431+28.082.40я431

T78

Труды X Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование (MARESEDU-2021)» Том II (III): [сборник]. Тверь: ООО «ПолиПРЕСС», 2021, 327 с.: ISBN 978-5-6047776-1-9.

Сборник «Труды X Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование (MARESEDU-2021)» представляет собой книгу тезисов докладов участников конференции, состоящую из трех томов. Сборник включает в себя главы, соответствующие основным секциям технической программы конференции: океанология, гидрология, морская геология, морская биология, геофизические исследования на акваториях, рациональное природопользование и подводное культурное наследие. Помимо основных секций на конференции были представлены секция научно-популярных фильмов и круглый стол "Плавающие университеты. России: новый виток развития", отдельный день работы конференции был отведен под международные сессии с участием ведущих иностранных ученых из Англии, Бельгии, Шотландии, США.

Все тезисы представлены в редакции авторов.

В рамках конференции участники обсудили состояние и перспективы развития комплексных исследований Мирового океана, шельфовых морей и крупнейших озер, актуальные проблемы рационального природопользования и сохранения биоразнообразия в водных пространствах, проблемы освоения ресурсов континентального шельфа, достижения науки в области морской геологии, современные подходы к исследованиям обширных акваторий дистанционными методами, проблемы устойчивого развития экосистем моря и прибрежной зоны, организацию и проведение комплексных экспедиционных исследований, преподавание «морских дисциплин», вопросы организации полевых практик студентов.

Подготовлено к выпуску издательством ООО «ПолиПРЕСС» по заказу ООО «Центр морских исследований МГУ имени М.В. Ломоносова».

ООО «ПолиПРЕСС»

170041, Россия, г. Тверь, Комсомольский пр-т, д. 7, пом. II polypress@yandex.ru

ООО «Центр морских исследований МГУ имени М.В. Ломоносова».

РФ, 119234, г. Москва, ул. Ленинские Горы, д. 1, стр. 77

(495) 648-65-58/ 930-80-58

Все права на издание принадлежат ООО «Центр морских исследований МГУ имени М.В. Ломоносова».

© ООО «Центр морских исследований МГУ имени М.В. Ломоносова», 2021
© ООО «ПолиПРЕСС»