



IX Международная научно-практическая конференция

«Морские исследования и образование»

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

MARESEDU-2020



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

26-30 октября 2020 г.

УДК [551.46+574.5](063)

ББК 26.221я431+26.38я431+28.082.40я431

Т78

Труды IX Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование (MARESEDU-2020)» Том I (III): [сборник]. Тверь: ООО «ПолиПРЕСС», 2020, 362 с.: ISBN 978-5-6045536-3-3.

Сборник «Труды IX Международной научно-практической конференции «Морские исследования и образование (MARESEDU-2020)» 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, геофизика, рациональное природопользование и подводное культурное наследие.

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.

Мероприятия проведено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект №20-05-22025.

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», 2020
© ООО «ПолиПРЕСС»

ИЗВЕСТКОВЫЕ ГУБКИ БЕЛОГО МОРЯ (CALCAREA, PORIFERA): МЕХАНИЗМЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ИЗ ДИССОЦИИРОВАННЫХ КЛЕТОК

Фролова Вероника Сергеевна^{1,2}, Скоренцева Ксения Витальевна³, Ересковский Александр Вадимович^{1,2,4}, Лавров Андрей Игоревич^{2,3,5}

¹ Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

⁴ Средиземноморский Институт экологии и биоразнообразия, Марсель, Франция

Введение

Губки (Porifera) являются наиболее древними из живущих ныне многоклеточных животных. Постоянно меняющиеся гидродинамические условия окружающей среды – причина непрерывных перестроек водоносной системы, посредством которой у этих организмов осуществляется питание и газообмен (Ereskovsky, 2010; Leys, Hill, 2012). Возможность таких перестроек – результат высокой пластичности и мобильности клеточных структур представителей типа Porifera.

Одной из форм такой пластичности является способность губок к reagregации – развитию из диссоциированных клеток. Впервые этот процесс был описан Уилсоном в 1907 году (Wilson, 1907), что стало отправной точкой для будущих многочисленных исследований. Результатом reagregации является образование многоклеточных агрегатов и примморфов разнообразного строения, а в некоторых случаях – полное восстановление функциональной губки (Wilson, 1907; Короткова, 1972; Ereskovsky et. al., 2016; Lavrov, Kosevich, 2014, 2016). На протяжении всего процесса reagregации клетки постоянно мигрируют и находятся в процессах дедифференцировки и трансдифференцировки (Ефремова, 1969, 1972; Короткова, 1972; Lavrov, Kosevich, 2016).

Исследование процесса reagregации в лабораторных условиях позволяет следить за преобразованиями клеточных типов, межклеточными взаимодействиями и формированием различных анатомических структур при прогрессивном развитии агрегатов и примморфов. Однако большая часть исследований подобного характера проведена на представителях класса Demospongiae, у которых основу тела представляет мезохил, который можно рассматривать как аналог тканей внутренней среды у высших многоклеточных. В противоположность им, у представителей класса Calcarea основу тела составляют пинакодермы и хоанодерма, являющиеся аналогами эпителиальных тканей высших Eumetazoa.

Целью данного исследования был анализ клеточных механизмов, задействованных в прогрессивном развитии примморфов у двух беломорских представителей класса Calcarea: *Leucosolenia cf. variabilis* и *Sycon sp.*

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны два представителя класса Calcarea: *Leucosolenia cf. variabilis* Haeckel, 1870 (пкл. Calcaronea, отр. Leucosolenida) и *Sycon sp.* Risso, 1827 (пкл. Calcaronea, отр. Leucosolenida).

Сбор образцов губок и эксперименты по reagregации проводились на базе Беломорской биостанции им. Н.А. Перцова. Культуры клеток губок были получены при помощи механического метода диссоциации и помещены в фильтрованную морскую воду. Каждый

день проводилась фотосъемка культур для прижизненного описания развития и морфологии многоклеточных агрегатов.

Подробное изучение строения основных стадий реагрегации губок, осуществлялось при помощи световой, трансмиссионной электронной и сканирующей микроскопии. Каждые 24 – 48 часов из культур выбирались агрегаты для фиксации 2,5% глутаровым альдегидом с последующей постфиксацией 1% раствором тетраоксида осмия.

Отслеживание формирующихся в процессе реагрегации спикул осуществляли при помощи помещения отдельных агрегатов в раствор динатриевой соли кальцеина с концентрацией 100 мг/л.

Отслеживание количества пролиферирующих клеток осуществлялось благодаря инкубации агрегатов в растворе 40 мкМ 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) с последующей фиксацией в 4% параформальдегиде. В дополнение было проведено окрашивание агрегатов антителами к ацетилированному α -тубулину (маркер жгутиков хоаноцитов) и фосфогистону H3 (маркер клеток, делящихся митозом). Образцы, полученные в результате иммуноцитохимического исследования, изучались при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа.

Результаты и обсуждение

Динамика реагрегации

Через 24 часа после диссоциации (далее чпд) в культурах *Leucosolenia* cf. *variabilis* и *Sycon* sp. наблюдалось формирование первичных многоклеточных агрегатов. Такие агрегаты имели разнообразные формы, крайне неровную поверхность и зачастую имели на своей поверхности пузыри. В составе первичных многоклеточных агрегатов можно выделить два типа клеток: ядрышковые амебоциты и хоаноциты. Мы предполагаем, что все остальные типы клеток претерпевают дедифференцировку после процесса диссоциации тканей и становятся неотличимы от амебоцитов.

Постепенно поверхность таких агрегатов становилась более сглаженной, что обусловлено формированием экзопинакоцитов на поверхности. С началом формирования экзопинакоцитов наступает вторая стадия реагрегации – стадия ранних примморфов. Так как у изученных нами видов в первичных многоклеточных агрегатах мы не идентифицировали экзопинакоциты, мы полагаем, что эти клетки возникают в результате трансдифференцировок хоаноцитов и амебоцитов.

Через некоторое время после того, как первичные многоклеточные агрегаты сформировались и перешли на стадию ранних примморфов, начинается их прогрессивное развитие. Постепенно поверхность примморфов *Leucosolenia* cf. *variabilis* полностью покрывается экзопинакоцитами (стадия настоящих примморфов); завершение эпителизации можно наблюдать уже к 15 суткам после диссоциации (далее – спд), однако есть различия между экзопинакоцитами в примморфах и экзопинакоцитами интактных тканей: у первых их форма уплощённая, тогда как у вторых – Т-образная.

Результаты иммуноцитохимического исследования подтвердили, что хоаноциты действительно способны сохраняться в процессе реагрегации известковых губок. В первичных многоклеточных агрегатах хоаноциты аккумулированы в основном в поверхностных слоях и их количество значительно выше, чем в ранних примморфах. Мы полагаем, что это связано с дедифференцировкой и трансдифференцировкой хоаноцитов.

Также в ходе прогрессивного развития внутри примморфов формируются полости, в просвет которых направлены жгутики хоаноцитов. Такие полости могут возникать в результате гибели клеток и, вероятно, являются предпосылкой к формированию водоносной системы.

В культурах *Sycon* sp. процесс реагрегации протекал более интенсивно: к 3 спд поверхность некоторых агрегатов полностью покрывалась экзопинакоцитами и уже начинали формироваться хоаноцитные полости. Под формирующимся слоем экзопинакодермы образовывалась прослойка фибриллярного внеклеточного матрикса, вероятно, коллагена. К 30 спд нами было обнаружено формирование обширной полости внутри агрегата, которая, вероятно, является презумптивной атриальной полостью.

Исследования по спикүлогенезу показали, что на 7 спд у *Sycon* sp. и на 10 спд у *Leucosolenia* cf. *variabilis* начинают формироваться первые триаكتины. На 16-17 спд у *Sycon* sp. обнаруживаются первые диактины, а формирование диактин у *Leucosolenia* cf. *variabilis* мы не наблюдали.

Ранее мы упоминали, что у губок можно обнаружить группы клеток, морфологически и функционально напоминающие эпителиальные ткани и ткани внутренней среды высших многоклеточных животных. Эпителиальным тканям высших многоклеточных животных соответствуют пинакодермы и хоанодерма, а тканям внутренней среды – совокупность клеток мезохила. При трансдифференцировке амебоцитов в хоаноциты, экзо- и эндопинакоциты у *Demospongiae* описано явление аналогичное тому, что у высших многоклеточных называется мезенхимально-эпителиальным переходом (далее – МЭП) (Ereskovsky et al., 2020). Так как у известковых губок некоторые ядрышкообразные амебоциты способны трансдифференцироваться в хоаноциты и пинакоциты, то в процессе реагрегации *Calcarea* также можно выделить процесс, аналогичный МЭП высших многоклеточных животных.

Пролиферативная активность клеток при реагрегации

Нами было проведено иммуноцитохимическое исследование пролиферативной активности клеток в процессе реагрегации на стадиях 24 – 240 чпд. Было установлено, что клетки в развивающихся агрегатах способны синтезировать ДНК и делиться митозом. Пролиферация клеток не играет важной роли в процессе реагрегации у *Leucosolenia* cf. *variabilis*, тогда как у *Sycon* sp. пролиферация клеток, вероятно, является одним из ключевых механизмов при прогрессивном развитии примморфов. Так, мы практически не наблюдали пролиферирующих клеток у *Leucosolenia* cf. *variabilis* как в первичных многоклеточных агрегатах, так и в примморфах. У *Sycon* sp. была замечена тенденция к возрастанию количества пролиферирующих клеток от 1 спд к 10 спд. Вероятно, увеличение количества пролиферирующих клеток – причина, по которой примморфы *Sycon* sp. достигают стадии прогрессивного развития быстрее, чем примморфы *Leucosolenia* cf. *variabilis*.

Заключение

Несмотря на то, что впервые процесс реагрегации губок был описан более 100 лет назад, исследователи обнаруживают новые аспекты этого явления по сей день. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что в процессе реагрегации губок участвуют по крайней мере три клеточных механизма: активная дедифференцировка клеток при попадании клеток в суспензию и формировании первичных многоклеточных агрегатов; трансдифференцировка хоаноцитов и амебоцитов при преобразовании агрегатов в

примморфы и в процессе прогрессивного развития примморфов; гибель клеток, в результате которой начинает формироваться система водоносных каналов.

В случае с *Leucosolenia* cf. *variabilis* реагрегация не сопровождается активной пролиферацией клеток в формирующихся агрегатах и примморфах, и весь процесс восстановления из диссоциированных клеток происходит благодаря миграциям клеток и их де- и трансдифференцировкам. В реагрегации *Sycon* sp. важную роль также играют миграции клеток, их де- и трансдифференцировки, а начало прогрессивного развития сопровождается активной пролиферацией клеток. Возможно, именно благодаря высокой пролиферативной активности клеток происходит увеличение клеточной массы у агрегатов и примморфов *Sycon* sp., что способствует их более активному развитию по сравнению с агрегатами и примморфами *Leucosolenia* cf. *variabilis*.

Благодарности

Исследование поддержано грантами РНФ №17-14-01089, РФФИ №19-04-00563 и РФФИ №19-04-00545.

Список литературы

Ефремова С.М. Морфологический анализ развития губки *Ephydatia fluviatilis* из диссоциированных клеток // Вестник ЛГУ. – 1969. – № 9. – С. 39-53.

Ефремова С.М. Морфофизиологический анализ развития пресноводных губок *Ephydatia fluviatilis* и *Spongilla lacustris* из диссоциированных клеток // Бесполое размножение, соматический эмбриогенез и регенерация / Отв. ред. Б.П. Токин. Л.: Изд-во ЛГУ. – 1972. – С. 110-154.

Короткова Г.П. Сравнительно-морфологические исследования развития губок из диссоциированных клеток // Бесполое размножение, соматический эмбриогенез и регенерация / Отв. ред. Б.П. Токин. Л.: Изд-во ЛГУ. – 1972. – С. 74-109.

Ereskovsky A.V. Comparative Embryology of Sponges. Springer Netherlands. – 2010.

Ereskovsky A.V., Chernogor L.I., Belikov S.I. Ultrastructural description of development and cell composition of primmorphs in the endemic Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis*// Zoomorphology. – 2016. – V. 135. – № 1. – P. 1-17.

Ereskovsky A.V., Tokina D.B., Saidov D.M., Baghdigian S., Le Goff E., Lavrov A.I. Transdifferentiation and mesenchymal-to-epithelial transition during regeneration in Demospongiae (Porifera)// J. Exp. Zool. Part B. – 2020. – V. 334. P. 37-58.

Lavrov A.I., Kosevich I.A. Sponge cell Reaggregation: Mechanisms and Dynamics of the Process // Rus. J. of Dev. Biol. – 2014. – V. 45. – № 4. – P. 205-223.

Lavrov A.I., Kosevich I.A. Sponge cell reaggregation: Cellular structure and morphogenetic potencies of multicellular aggregates// J. Exp. Zool. Part A. – 2016. – V. 325. – № 2. – P. 158-177.

Leys S.P., Hill A. The physiology and molecular biology of sponge tissues// Adv. Mar. Biol. – 2012. – V. 62. – P. 1-56.

Wilson H.V. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges // J. Exp. Zool. – 1907. – V. 5. – № 2. – P. 245-258.