

УДК [551.46+574.5](063)

ББК 26.221я431+26.38я431+28.082.40я431

Т78

**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 "Плавучие 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»

КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ ИЗВЕСТКОВОЙ ГУБКИ  
*LEUCOSOLENIA VARIABILIS*

CELLULAR MECHANISMS OF REGENERATION IN CALCAREOUS SPONGE  
*LEUCOSOLENIA VARIABILIS*

**Лавров А.И.<sup>1</sup>, Скоренцева К.В.<sup>2</sup>, Саидов Д.М.<sup>3</sup>, Большаков Ф.В.<sup>1</sup>, Мельников Н.П.<sup>4</sup>,  
Саидова А.А.<sup>2</sup>, Ересковский А.В.<sup>5,6,7</sup>**

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

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

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

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

<sup>5</sup> Средиземноморский институт биоразнообразия и экологии, ИЦНИ, Университет Экс-Марсель, Франция

<sup>6</sup> Кафедра эмбриологии, Биологический факультет, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия

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

**Lavrov A.I.<sup>1</sup>, Skorentseva K.V.<sup>2</sup>, Bolshakov F.V.<sup>1</sup>, Saidov D.M.<sup>3</sup>, Melnikov N.P.<sup>4</sup>, Saidova A.A.<sup>2</sup>, Ereskovsky A.V.<sup>5,6,7</sup>**

<sup>1</sup> Pertsov White Sea Biological Station, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Department of Cell Biology and Histology, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Department of General Ecology and Hydrobiology, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>4</sup> Department of Invertebrate Zoology, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

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

<sup>6</sup> Department of Embryology, Biological faculty, Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia

<sup>7</sup> 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  $\beta$ -актина и  $\alpha$ -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 (раневая 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  $199.6 \pm 5.188 \text{ мкм}^2$  ( $n=266$ ), циркулярность  $0.6745 \pm 0.006$  ( $n=268$ ) и AR  $1.514 \pm 0.0186$  ( $n=256$ ). При формировании РМ происходит уплощение экзопинакоцитов, их площадь и циркулярность значительно изменяются до  $231.2 \pm 6.367 \text{ мкм}^2$  ( $n=196$ ;  $p=0.0001$ ) и  $0.6286 \pm 0.0081$  ( $n=196$ ;  $p<0.0001$ ), соответственно. Значимых изменений AR не происходит. Интактные хоаноциты представляют собой призматические клетки с площадью  $29.74 \pm 0.5146 \text{ мкм}^2$  ( $n=131$ ), циркулярностью  $0.9071 \pm 0.0042$  ( $n=131$ ) и AR  $1.177 \pm 0.0083$  ( $n=129$ ). 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  $89.63 \pm 7.535 \text{ мкм}^2$  ( $n=50$ ;  $p<0.0001$ ), циркулярность снижается до  $0.6499 \pm 0.0189$  ( $n=52$ ;  $p<0.0001$ ), AR повышается до  $1.56 \pm 0.0493$  ( $n=51$ ;  $p<0.0001$ ).

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 асconoидной 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.