

Реагрегация клеток у губок

А.И.Лавров,

аспирант кафедры зоологии беспозвоночных
биологического факультета МГУ им.М.В.Ломоносова

И.А.Косевич,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник той же кафедры

Губки (Porifera) — одни из самых примитивных многоклеточных животных. Это прикрепленные организмы, у которых нет ни нервной системы, ни мускулатуры, ни рта, ни кишечника. Тем не менее, анатомическая и клеточная организация губок не так уж и проста. Все их тело пронизывает сложно устроенная водоносная система. Начинается она на поверхности губок тысячами мельчайших пор (остий), через которые вода проникает в каналы, по ним достигает жгутиковых камер, затем через выводные каналы попадает в общую полость и выходит во внешнюю среду через большое отверстие — оскулюм.

Клетки, составляющие тело губок, дифференцированы на несколько типов, но совсем не такие, как у других многоклеточных животных. Жгутиковые камеры выстланы особыми жгутиковыми клетками — хоаноцитами. Их жгут окружен воротничком из двух десятков цитоплазматических микроворсинок. Биение жгутов хоаноцитов обеспечивает прокачивание воды через организм губки. Взвешенные в воде мелкие частицы (бактерии, комочки детрита) прилипают к микроворсинкам, захватываются и перевариваются в цитоплазме самих хоаноцитов или передаются для переваривания другим клеткам. Поверхность губки одета слоем уплощенных клеток — пинакоцитов. Каналы водоносной системы выстланы другой разновидностью пинакоцитов.

Основной объем губки занят мезохилом, который образован белком, близким к коллагену (белку соединительной ткани других многоклеточных). Сквозь мезохил тянутся тяжи особого белка губок — спонгина. В мезохиле помещаются иглы минерального скелета — спикулы. У некоторых губок они известковые, но у большинства видов состоят из гидратированной двуокиси кремния — опала. Мезохил наполнен разнообразными клеточными элементами. Одни из них производят коллаген мезохила, другие продуцируют спонгин, третьи заняты изготовлением минеральных спикул. Блуждающие амебоидные клетки мезохила переваривают частицы, полученные ими от хоаноцитов, и разносят пищу по всему организму. Амебоциты способны дифференцироваться в другие типы клеток, в том числе и в половые. Мезо-

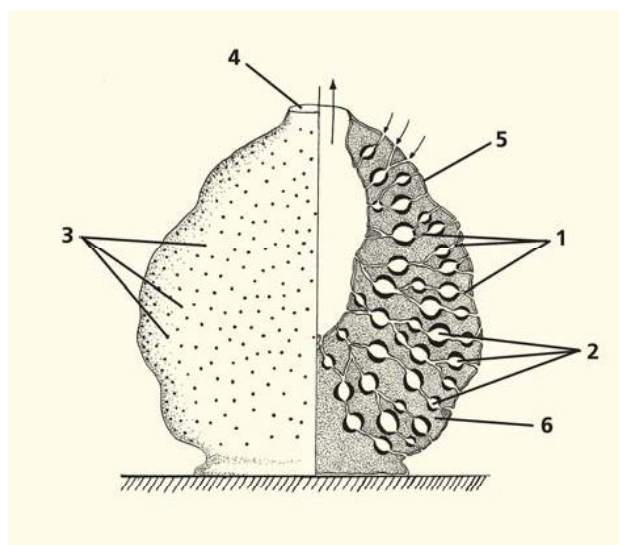


Схема организации взрослой особи губки. Единственная обособленная структура в теле — водоносная система, состоящая из каналов (1) и жгутиковых камер (2). Вода проникает через множественные мелкие отверстия на теле животного — остии (3), а выбрасывается через оскулюм (4). Снаружи тело губки покрыто непрерывным слоем уплощенных клеток — экзопинакодермой (5). Весь объем тела между экзопинакодермой и каналами водоносной системы заполнен мезохилом (6). Стрелки на схеме показывают направление токов воды через водоносную систему.

хил губок заселен симбиотическими бактериями и водорослями. В общем, к губкам вполне применимо высказывание французского биолога Г.Гаррона: «Примитивные, но не простые».

Губки всегда были интересны биологам как рано обособившаяся группа многоклеточных, которая пошла в своей эволюции по совсем другому пути, чем остальные животные. Но в последние годы к губкам появился и чисто практический интерес. Дело в том, что помимо всего перечисленного, в мезохиле губок есть множество клеток с различными включениями, которые содержат хиноны, гликозиды и другие биологически активные вещества. Самим губкам они нужны для того, чтобы защищаться от болезнетворных бактерий, грибков и отпугивать животных, которые хотели бы использовать губок для питания. Оказалось,

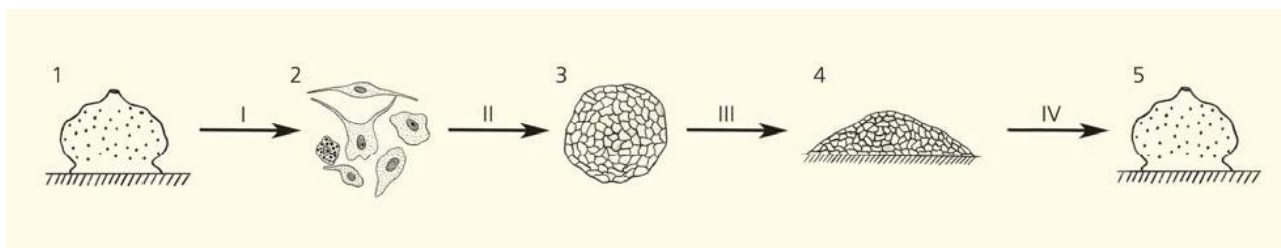


Схема эксперимента Г.Вилсона с губкой *Microciona prolifera*. 1 — взрослая особь *M. prolifera*; 2 — суспензия клеток губки; 3 — многоклеточный агрегат; 4 — агрегат, прикрепившийся к покровному стеклу; 5 — особь *M. prolifera*, восстановившаяся в процессе реагрегации клеток; I — механическая диссоциация губки; II — формирование многоклеточных агрегатов; III — прикрепление агрегатов к субстрату; IV — восстановление исходной организации губки.

однако, что биологически активные вещества, извлекаемые из губок, можно использовать как лекарства, в том числе и для лечения злокачественных опухолей.

Уникальная черта взрослых губок — способность всех клеток к активному перемещению и смене функций. Более того, структуры водоносной системы в течение жизни губок постоянно перестраиваются: каналы и камеры «разбираются» на отдельные клетки и заново формируются в других участках тела, а могут перемещаться и без разборки на клетки [1]. Такая лабильность структур позволяет губкам быстро и адекватно реагировать на изменение гидродинамических условий среды.

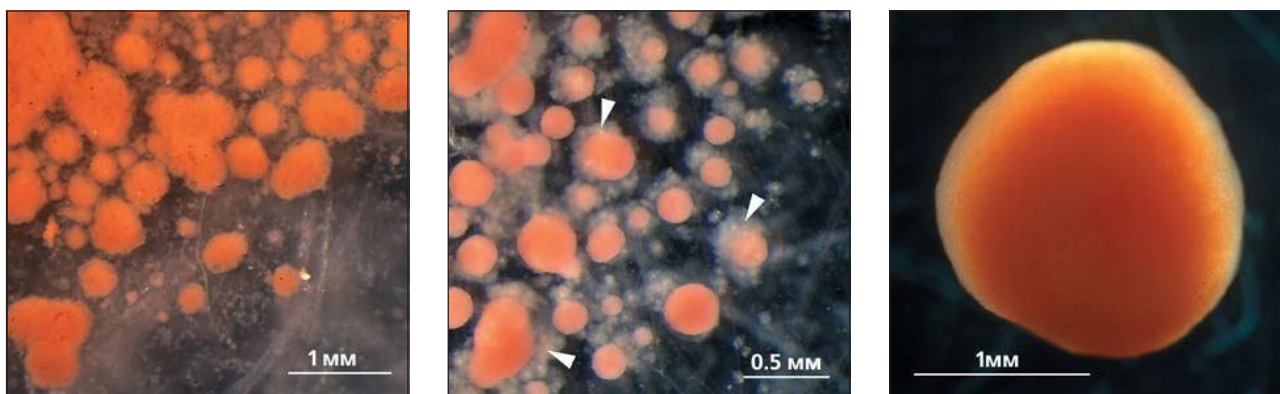
Одной из форм проявления пластичности губок можно назвать процесс реагрегации клеток, который впервые описал американский ученый Г.Вилсон в 1907 г. [2]. Он протер фрагменты тела губки *Microciona prolifera* через мелкоячеистую ткань и получил суспензию живых клеток, которые

оказались способны объединяться друг с другом и образовывать многоклеточные агрегаты. В опытах Вилсона агрегаты прикреплялись к субстрату и восстанавливали исходную организацию губки. У других видов полноценной регенерации губок получить не удалось [3, 4]. Тем не менее, этот процесс привлек внимание исследователей, так как является удобной лабораторной моделью, которая позволяет в контролируемых условиях изучать поведение отдельных типов клеток (деление, миграцию, дифференцировку, апоптоз), а также восстановление их связей и формирование основных структурных элементов организма.

Мы изучали процесс реагрегации клеток у нескольких видов губок, обитающих в окрестностях ББС, — *Halicbondria panicea*, *Haliclona aquaeductus*, *Haliclona cinerea*. Кусочки губок мы протирали через мелкоячеистое сито и помещали в сосуды со стерильной морской водой. Как же выглядела только что полученная суспензия клеток?



Клетки *Haliclona cinerea* в суспензии, полученной механической диссоциацией губки. Слева — клетка, образующая псевдоподии (показаны стрелками); справа — реагрегирующие клетки.



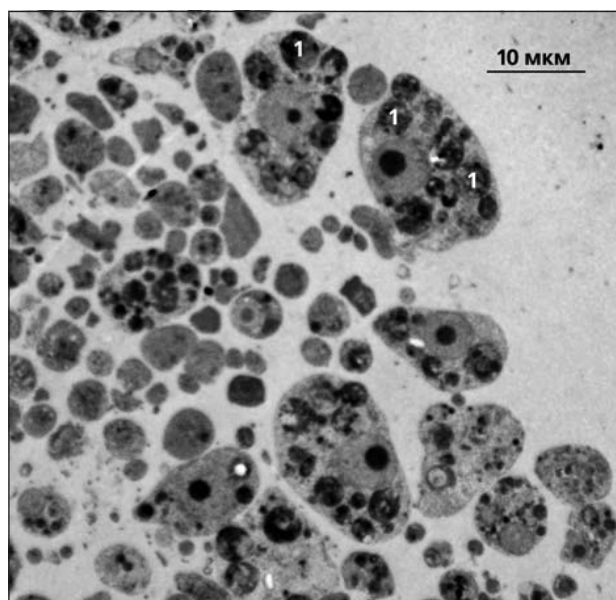
Стадии процесса реагрегации клеток *Haliclona aquaeductus*. Слева — первичные клеточные агрегаты (24 ч после диссоциации губки); в центре — сортировка клеток в первичных клеточных агрегатах (72 ч после диссоциации губки); справа — примморфа (20 сут после диссоциации губки). Белые стрелки указывают на оболочку из мертвых клеток и детрита.

Большинство клеток успешно пережили механическую диссоциацию и активно меняли свою форму. Хоаноциты втягивали жгутик, и у них, как и у других клеток, появлялись псевдоподии. Ими клетки как бы «ощупывали» субстрат, и если встречались с псевдоподиями соседей, начинали сближаться и формировать агрегаты. Такое пассивное поведение клеток протертой губки было описано еще для одного беломорского вида — *Halisarca dujardini* [5]. У других видов клетки сохраняют амeboидную подвижность, и агрегаты формируются за счет случайных встреч активно передвигающихся клеток [3, 6]. Такая подвижность диссоциированных клеток при формировании агрегатов характерна для более организованных животных — стрекающих кишечнорастворителей, например для обыкновенной гидры [7, 8].

Через сутки после диссоциации губок в сосудах формируются первичные клеточные агрегаты. Они имеют округлую форму и размеры 0.1–0.5 мм, а потому заметны даже невооруженным глазом. Мелкие клетки (размером 2–5 мкм), образовавшиеся из хоаноцитов и пинакоцитов, беспорядочно перемешаны с более крупными клетками мезохила (размером 8–20 мкм). Лишь изредка между отдельными клетками можно увидеть специализированные клеточные контакты. Крупные клетки активно захватывают и поглощают мелкие. На срезах через агрегаты видно, что в крупных клетках содержится множество пищеварительных вакуолей — фагосом.

Через трое суток после диссоциации начинается сортировка клеток первичных агрегатов. Крупные клетки, образовавшиеся из элементов мезохила, уплотняются в центральную массу. Вокруг нее формируется рыхлая наружная оболочка, состоящая из мертвых, преимущественно мелких клеток, образовавшихся из пинакоцитов и хоаноцитов.

Через пять–восемь суток после диссоциации первичные агрегаты превращаются в трехмер-



Срез первичного клеточного агрегата *Halichondria panicea* (72 ч после диссоциации губки). На срезе присутствуют клетки двух размерных классов. В крупных клетках видны фагосомы (1). Между клетками заметны обширные промежутки, у живых агрегатов, вероятно, заполненные внеклеточным матриком. Фотография сделана с помощью трансмиссионного электронного микроскопа.

ные, сферической формы образования (примморфы), при этом они освобождаются от оболочки из мертвых клеток и детрита и приобретают специализированные покровы. У вида *Suberites domuncula*, поверхность примморф покрыта непрерывным слоем пинакоцитов [9, 10]. Примморфы исследованных нами видов из рода *Haliclona* одеты пинакоцитами не полностью, а у представителя другого рода *Halichondria panicea* на поверхности примморф формируется гладкий слой внеклеточного матрикса.

У исследованных видов губок примморфы были последней стадией реагрегации. Они сохраняли жизнеспособность более месяца, и за это время сливались друг с другом, увеличивались в размерах, но восстановления исходной организации губок в наших опытах наблюдать не удалось.

Из литературы известно, что у некоторых видов губок развитие примморф заканчивается восстановлением исходной организации [5, 6, 11]. Ключевой момент в этом процессе — прикрепление примморф к субстрату. Это означает формирование апико-базальной полярности, что сопровождается значительными изменениями в распределении различных типов клеток внутри примморф. После прикрепления к субстрату в них начинают формироваться элементы водоносной системы — каналы и жгутиковые камеры. Сначала они изолированы друг от друга, но вскоре начинают постепенно объединяться. Заканчивается весь процесс восстановления образованием осклярного отверстия водоносной системы, после чего она начинает нормально функционировать.

Если примморфы не прикрепилась к субстрату, они могут сохранять жизнеспособность до 10 месяцев. Хотя водоносная система у них не восстанавливается, некоторые признаки физиологии полноценных губок все же проявляются. Например, в них формируются неорганические скелетные элементы (спикулы) и синтезируются биологически активные вещества [12, 13].

Наши исследования примморф, образовавшихся из диссоциированных беломорских губок, находятся на начальном этапе. Мы надеемся, что дальнейшая работа в этом направлении даст возможность детально изучить поведение изолированных клеток, судьбу клеточных типов и характер взаимодействия между ними, исследовать роль симбиотических микроорганизмов в процессе реагрегации. Примморфы могут послужить модельной системой для фундаментальных исследований физиологии и биологии развития губок, а также в качестве системы для получения перспективных биологически активных веществ на основе биотехнологических подходов. ■

Литература

1. Ересковский А.В. Сравнительная эмбриология губок (Porifera). СПб., 2005.
2. Wilson H.V. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges // Journal of Experimental Zoology. 1907. V.5. №2. P.245—258.
3. Galtsoff P. The amoeboid movement of dissociated sponge cells // Biological Bulletin. 1923. V.45. №3. P.153—161.
4. Gaino E., Burlando B. Sponge cell motility: A model system for the study of morphogenetic processes // Bolletino di zoologia. 1990. V.57. №2. P.109—118.
5. Волкова М.А., Золоторева Г.А. Развитие *Halisarca dujardini* Johnston из конгломератов соматических клеток // Морфогенез у губок. Л., 1981. С. 74—93.
6. Короткова Г.П. Сравнительно-морфологические исследования развития губок из диссоциированных клеток // Бесполое размножение, соматический эмбриогенез и регенерация. Л., 1972. С. 74—109.
7. Technau U., Cramer V.L., Rentzsch F. et al. Parameters of self-organization in Hydra aggregates // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 2000. V.97. №22. P.12127—12131.
8. Kishimoto Y., Murate M., Sugiyama T. Hydra regeneration from recombined ectodermal and endodermal tissue. I. Epibolic ectodermal spreading is driven by cell intercalation // Journal of Cell Science. 1996. V.109. P.763—772.
9. Custudio M.R., Prokic I., Steffen R. et al. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death // Mechanisms of Ageing and Development, 1998. V.105. №1—2. P.45—59.
10. Müller W.E.G., Wiens M., Batel R. et al. Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula* // Marine Ecology Progress Series. 1999. V.178. №1. P.205—219.
11. Ефремова С.М. Морфологический анализ развития губки *Ephydatia fluviatilis* из диссоциированных клеток // Вестник Ленинградского университета. 1969. №9. С.39—53.
12. Chernogor L.I., Denikina N.N., Belikov S.I. et al. Formation of spicules during the long-term cultivation of primmorphs from the freshwater Baikal sponge *Lubomirskia baikalensis* // Organic Chemistry: Current Research. 2011. doi: 10.4172/2161-0401.S2-001
13. Müller W.E.G., Bohm M., Batel R. et al. Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: synthesis of avarol by primmorphs from *Dysidea avara* // Journal of Natural Products. 2000. V.63. №8. P.1077—1081.