МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Мельников Николай Петрович

Клеточные механизмы в основе пластичности тканей губок

Специальность 1.5.12. Зоология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре зоологии беспозвоночных биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: *Лавров Андрей Игоревич – кандидат биологических наук*

Официальные оппоненты: *Алешин Владимир Вениаминович – доктор биологических наук, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, отдел эволюционной биохимии, ведущий научный сотрудник*

Долматов Игорь Юрьевич – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, старший научный сотрудник, Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, директор

Костюченко Роман Петрович – кандидат биологических наук, доцент, Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, кафедра эмбриологии, и.о. заведующего кафедрой

Защита диссертации состоится «21» декабря 2026 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.8 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1.
E-mail: ksenperf@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: https://dissovet.msu.ru/dissertation/4132

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук  К.С. Перфильева

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Представители типа Губки (Porifera) демонстрируют широкие способности к перестройке внутренних структур: в ответ на изменения в окружающей среде, при формировании зон роста, в ходе бесполого размножения и репаративной регенерации. Подобные проявления пластичности тканей несут для губок непосредственное адаптивное значение и являются важным аспектом жизнедеятельности этих животных.

Пластичность тканей губок имеет и более широкий – эволюционный – контекст. Согласованное поведение клеток лежит в основе морфогенетических процессов у всех животных. Наиболее ярко эти процессы проявляются в ходе эмбриогенеза и репаративной регенерации, но интактные ткани животных также являются динамичными структурами, для которых характерна физиологическая регенерация – постоянное замещение нефункциональных клеток.

Процесс возобновления тканей зафиксирован для представителей всех крупных клад многоклеточных животных, а основные его механизмы – клеточная пролиферация, клеточная гибель, миграция и дифференцировка клеток – подробно описаны на модельных объектах. Тем не менее, систематические исследования механизмов поддержания тканевого гомеостаза на немодельных объектах редки; многообещающими объектами в данном контексте являются представители типа Porifera, который часто рассматривают в качестве сестринской к остальным Metazoa группы.

Исследования по репаративной регенерации и возобновлению тканей губок носят фрагментарный характер. Дискуссионными остаются вопросы устройства системы стволовых клеток, путей клеточной (транс)дифференцировки, функциональности каскадов запрограммированной клеточной гибели и межклеточной коммуникации. Все вышеперечисленное подчеркивает актуальность комплексного экспериментального изучения механизмов пластичности тканей губок на клеточном и молекулярно-генетическом уровнях организации.

Цель работы – охарактеризовать механизмы поддержания тканевого гомеостаза в ходе физиологической и репаративной регенераций у губок *Halisarca dujardinii* (Demospongiae) и *Leucosolenia corallorrhiza* (Calcarea) на морфологическом и молекулярном уровнях.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи:**

1) Описать основные популяции пролиферирующих клеток и количественно охарактеризовать активность пролиферации в интактных тканях;
2) Оценить динамику пролиферации основных популяций пролиферирующих клеток в интактных тканях;
3) Проследить судьбу потомков пролиферирующих клеток на основе их морфологии и локализации в тканях;
4) Охарактеризовать экспрессию основных генетических программ, ассоциированных с восстановлением целостности тканей в ходе репаративной регенерации;
5) Проверить функциональность апоптотического каскада с помощью *in silico* реконструкции и экспериментов по индукции клеточной гибели и количественно оценить активность клеточной гибели в интактных тканях.

Объект и предмет исследования. Объектом настоящего исследования являются основные принципы поддержания гомеостаза тканей у губок в ходе физиологической и репаративной регенерации. Предметом исследования являются механизмы, обеспечивающие динамику тканей губок: пролиферация клеточных популяций, миграция и дифференцировка их потомков, элиминирование клеток с помощью запрограммированной клеточной гибели.

Научная новизна. Настоящая работа представляет собой первое систематическое исследование динамики тканей у губок. Впервые показана возможность синхронизации пролиферирующих клеток в интактных тканях морских животных.

Впервые для губок проведено описание активности пролиферации в различных участках тела, а для хоаноцитов достоверно выявлены длительности как всего клеточного цикла, так и отдельных его фаз. Эксперименты по отслеживанию потомков пролиферирующих клеток позволили установить принципиальную разницу в динамике тканей у исследуемых объектов.

Для исследуемых видов были получены качественные аннотированные сборки генома (*H. dujardinii*) и транскриптома (*L. corallorrhiza*). На примере *H. dujardinii* предложен метод сравнительного анализа транскрипционного ландшафта различных типов регенерации.

Проведена первая сравнительная реконструкция структуры апоптотического каскада у губок. Продемонстрирована возможность индукции клеточной гибели и получены первые комплексные морфологические описания процессов клеточной гибели в клетках губок.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенное исследование существенно расширяет современные взгляды на динамику тканей у губок. Наличие в хоанодерме значительного количества медленно пролиферирующих клеток служит дополнением к устоявшимся взглядам на системы стволовых клеток у животных, согласно которым соматические стволовые клетки, как правило, немногочисленны и редко делятся.

Установлен набор генов/транскриптов, потенциально являющихся маркерами стволовых клеток у губок. Результаты экспериментов зафиксировали разобщенность экспрессии маркеров стволовых клеток и программ регуляции клеточного цикла, а также вовлеченность сигнальных каскадов Wnt, Hippo и TGF-β в восстановление целостности тканей.

Продемонстрированная в работе схема индукции клеточной гибели у губок открывает широкие возможности для изучения эволюции этого процесса. Зарегистрированные процессы клеточной гибели носят смешанный характер, демонстрируя признаки и апоптоза, и некроза. При этом выявленный в процессе *in silico* реконструкции набор белков-участников апоптотического каскада свидетельствует о возможности развития клеточной гибели по типу апоптоза; идентифицированные белки могут составлять эволюционное «ядро» апоптотического каскада.

Особенности скорости возобновления интактных тканей и динамика экспрессии программ поддержания стволовых клеток и пролиферации дают основания для пересмотра природы репаративных процессов у губок. Полученные в ходе работы данные предполагают морфаллактический характер репаративных процессов не только у Calcarea (что было известно и ранее), но и у Demospongiae: в исследованных организмах репаративная регенерация обеспечивается за счет трансдифференцировки и миграции клеток без активного вклада клеточной пролиферации.

Материалы настоящей работы могут войти в курсы лекций и учебные пособия по общей и частной зоологии и биологии развития. Практическое применение полученные результаты могут найти в разделах биологии развития, клеточной биологии, медицины, биотехнологии.

Методология и методы исследования. В основе работы лежит экспериментальный подход, подразумевающий содержание живых губок и модуляцию их процессов жизнедеятельности. Для выполнения поставленных задач и получения наиболее достоверных результатов был использован широкий набор методов, позволяющий вести исследования сразу на нескольких уровнях организации биологических систем. Описание общей организации тканей и морфологии клеток проводили с помощью классических

методов световой и электронной микроскопии, дополняя анализ иммуноцитохимической окраской цитоплазмы для изучения с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ). Активность пролиферации и клеточной гибели исследовали методами иммуноцитохимической окраски тканей для КЛСМ и проточной цитофлуориметрии. *In silico* идентификацию генов/транскриптов интереса и характеристику их паттернов экспрессии проводили биоинформатическими методами – через сборку и аннотацию референсных геномных/транскриптомных баз, предсказание доменной структуры и филогенетический анализ кодируемых белков-кандидатов, анализ дифференциальной экспрессии и коэкспрессии.

Положения, выносимые на защиту:

1) Общим для губок типом стволовых клеток является обширная популяция медленно пролиферирующих хоаноцитов;

2) Процессы репаративной регенерации у губок проходят по механизму морфаллаксиса и опираются преимущественно на трансдифференцировку и миграцию клеток, нежели на активацию клеточной пролиферации;

3) Несмотря на наличие у общего предка Porifera и Eumetazoa ключевых компонентов апоптотического каскада, запрограммированная клеточная гибель у губок может демонстрировать морфологические и молекулярно-биохимические отклонения от классической картины развития апоптоза.

Степень достоверности работы. Достоверность полученных данных обеспечена использованием широкого спектра методов и тщательной разработкой дизайна экспериментов. Каждый набор экспериментов включал достаточное для статистического анализа количество наблюдений. Подготовка к экспериментам включала предварительные работы по установлению оптимальных условий воздействия и обработки зафиксированного материала. Анализ данных проводился с тщательным контролем качества результатов и использованием общепринятых практик в статистике и биоинформатике. Для обеспечения воспроизводимости результатов подготовлены список использованных реактивов и полные версии протоколов по пробоподготовке.

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена лично автором с учетом замечаний и рекомендаций научного руководителя. Сбор живого материала, постановка экспериментов и обработка материала были осуществлены с персональным участием соискателя. Фотографии, рисунки, таблицы и схемы к тексту диссертации являются оригинальными. Работа была проведена в рамках проектов, выполняемых коллективом исследователей,

поэтому ряд результатов получен непосредственно с участием коллег автора. Это относится к: 1) постановке экспериментов по реагрегации *H. dujardinii* (в котором участвовали также Лавров А.И. и Скоренцева К.В.); 2) получению данных по морфологическому строению агрегатов (Лавров А.И., Большаков Ф.В. и Ересковский А.В.); 3) получению данных секвенирования РНК стадий регенерации стенки тела *H. dujardinii* (Борисенко И.Е.) и *L. corallorrhiza* (Лавров А.И., Скоренцева К.В.); 4) подготовке и съемке конфокальных стэков для обучения сверточных нейронных сетей (Зеленина А.И.); 5) приготовлению ультратонких срезов тканей губок после индукции клеточной смерти (Большаков Ф.В.); 6) обсуждению и трактовке полученных результатов.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены и обсуждены на следующих конференциях: 12th World Sponge Conference – Sponges: discovery and conservation in a changing planet (2025), Всероссийская научная конференция с международным участием, посвящённая юбилею академика Б.Л. Астаурова «Генетика и индивидуальное развитие» (2024), Всероссийская научная конференция с международным участием, посвящённая 85-летию Беломорской биостанции им. Н.А. Перцова Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (2023), XI Международная научно-практическая конференция «Морские исследования и образование (MARESEDU)» (2022), 11th World Sponge Conference (2022), Юбилейная научная конференция «Николай Константинович Кольцов и биология XXI века» (2022).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных к защите в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук. Вклад автора является весомым во всех публикациях по теме диссертации. Автором проведены получение, количественный и статистический анализ данных КЛСМ [1, 2, 4], разработан метод анализа клеточного цикла [2], осуществлен биоинформатический анализ [5,7], а также поиск и анализ литературы [1,2,3,5,6,7]. Автор также принимал участие в обсуждении, написании и редактировании текстов всех представленных работ. Вклад автора отражен в списке публикаций на стр. 24 автореферата.

Структура диссертации. Текст работы изложен на 250 страницах и состоит из глав «Введение», «Обзор литературы», «Материал и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», содержит список сокращений, список литературы и Приложение. Список литературы содержит 334 источника: 3 на русском и 331 на иностранных языках. Приложение

представлено таблицами, иллюстративным материалом и протоколами подготовки образцов. Иллюстративный материал содержит 70 изображений в виде иллюстраций и схем (51 в основном тексте – 1 к разделу «Материал и методы исследования», 49 к разделу «Результаты», 1 к разделу «Обсуждение» – и 19 в Приложении).

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Введение

Во введении обоснована актуальность темы исследования, её научная новизна, показана степень разработанности темы, теоретическая и практическая значимость, поставлены цель и задачи, сформулированы положения, выносимые на защиту.

2. Обзор литературы

Обзор литературы включает в себя четыре раздела. Первый раздел посвящен общим принципам интеграции и поддержания гомеостаза тканей у многоклеточных животных. Рассматриваются вопросы разнообразия систем соматических стволовых клеток (ССК) и механизмов модуляции их активности. Обсуждается физиологическая роль и морфология клеточной гибели в интактных тканях животных. Приведены описание канонической структуры апоптотического каскада и его эволюционная история.

Остальные разделы обзора литературы суммируют современные представления о динамике тканей губок. Затрагиваются общие вопросы биологии губок: анатомо-гистологические особенности организации и примеры проявления пластичности тканей. Систематизированы описания популяций пролиферирующих клеток и экспрессии молекулярно-генетических маркеров стволовых клеток в интактных тканях губок. Обсуждается потенциальное разнообразие систем ССК и механизмов регенерации в различных филогенетических линиях типа Porifera. Наконец, приведены известные данные по структуре апоптотического каскада и механизмам элиминирования клеток у губок.

3. Материал и методы

Материал. В ходе экспериментов использовали взрослых особей *Leucosolenia corallorrhiza* (Haeckel, 1872) (Calcarea, Leucosolenida) и *Halisarca dujardinii* Johnston, 1842 (Demospongiae, Chondrillida) вне репродуктивного цикла. Сбор животных проводили вручную на сублиторали в окрестностях Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (ББС МГУ). Общее количество

собранных особей составило 547 губок; точное количество особей для каждого эксперимента приведено в Приложении.

Методы. Общий уровень пролиферации оценивали через распределение клеток по содержанию ДНК методом проточной цитофлуориметрии. Методом КЛСМ пролиферирующие клетки выявляли: 1) в S-фазе клеточного цикла с помощью инкубации интактных губок в фильтрованной морской воде с добавлением меченых нуклеотидов EdU и 2) в M-фазе клеточного цикла посредством иммуноцитохимической окраски к фосфорилированному гистону 3 (pH3). Идентификацию пролиферирующих клеток проводили по морфологии клеток, выявляемой с помощью цитоплазматической окраски (DBCO). Отслеживание потомков пролиферирующих клеток проводили в ходе эксперимента, при котором губок после инкубации в растворе EdU содержали в аквариуме с естественной морской водой. Для оценки пролиферирующего пула (доли всех пролиферирующих клеток в какой-либо из фаз клеточного цикла) применяли синхронизацию клеток в S-фазе за счет инкубации в ингибиторе ДНК-полимеразы афидиколине. Анализ длительности клеточного цикла хоаноцитов и отдельных его фаз проводили с применением математической модели Сандерса и коллег (Sanders, Varedi, French, 1993).

Исследование молекулярно-генетических основ пластичности тканей исследуемых видов проводили по результатам секвенирования тотальной мРНК через анализ дифференциальной экспрессии (DESeq2) и коэкспрессии (WGCNA/fuzzy c-means) в ходе репаративных морфогенезов. Библиотеки для секвенирования были выделены из стадий реагрегации (регенерации из суспензии отдельных клеток) *H. dujardinii* и регенерации стенки тела *L. corallorrhiza*.

Клеточную гибель в тканях губок индуцировали с помощью теплового шока и инкубации в стауроспорине. Ультраструктурные особенности клеточной гибели изучали методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ); для КЛСМ были использованы методы изучения активности эффекторных каспаз (CellEvent Caspase3/7 Detection Reagent, CE) и выявления ядер с фрагментированной ДНК (TUNEL).

In silico реконструкцию апоптотического каскада проводили через идентификацию последовательностей, кодирующих гомологи апоптотических белков. В ходе анализа данные по *H. dujardinii* и *L. corallorrhiza* были дополнены находящимися в открытом доступе геномами *Lycopodina hypogea* и *Amphimedon queenslandica* (Demospongiae), *Sycon ciliatum* (Calcarea) и *Oscarella lobularis* (Homoscleromorpha). Поиск последовательностей-кандидатов проводили с помощью инструментов blast и hmmsearch, а

предсказание доменной структуры – в InterProScan; для анализа крупных белковых семейств использовали реконструкцию филогенетических отношений методом максимального правдоподобия.

Статистический анализ и визуализацию количественных данных проводили в R. Для анализа изображений и подсчета клеток использовали Bitplane Imaris и ImageJ. С целью автоматизации подсчета пролиферирующих клеток на базе Python был разработан алгоритм, задействующий сверточные нейронные сети StarDist3D и UNet.

4. Результаты

Пролиферация в интактных тканях губок. В интактных тканях *H. dujardinii* и *L. corallorrhiza* подавляющее большинство как синтезирующих ДНК, так и митотических клеток составляют жгутиковые клетки водоносной системы, хоаноциты (Рисунок 1А-В, Д). Расположение и ориентация митотических пластинок говорит о симметричном характере деления хоаноцитов, при котором обе дочерние клетки остаются в пределах хоаноцитных камер/хоанодермы (Рисунок 1А-В). Доля синтезирующих ДНК клеток поддерживается на приблизительно одинаковом уровне 8-10% во всех участках тела, содержащих хоаноциты (Рисунок 1Г-Г’). В лишенных хоаноцитов участках тела наблюдается достоверно меньшее количество ДНК-синтезирующих клеток (Рисунок 1Г-Г’). Пролиферирующие клетки вне хоаноцитных камер у *H. dujardinii* представлены преимущественно клетками мезохила – археоцитами (Рисунок 1Е). В случае *L. corallorrhiza* синтезирующие ДНК амебоидные клетки в мезохиле единичны, и пролиферация вне хоанодермы поддерживается в основном пороцитами и пинакоцитами (Рисунок 1Ж).

Динамика клеточного цикла хоаноцитов. Обратимая блокировка S-фазы афидиколином позволяет синхронизировать пролиферирующие клетки: после снятия блока общая доля EdU-положительных клеток возрастает в 4–5 раз. Основной вклад в наблюдаемое увеличение вносят хоаноциты (Рисунок 2А, Б). Пролиферирующий пул хоаноцитов составляет 38,3±6,8% у *H. dujardinii* и 57,2±14,5% у *L. corallorrhiza*. Была исследована динамика вхождения хоаноцитов в S-фазу: в интактных тканях увеличение длительности инкубации в EdU с 2 до 6 ч приводит к статистически значимому увеличению доли меченых хоаноцитов с 11,5±1,9% до 14,6±1,6% (*H. dujardinii*) и с 14,2±1,6% до 17,9±1,5% (*L. corallorrhiza*) (Рисунок 2В, Г).

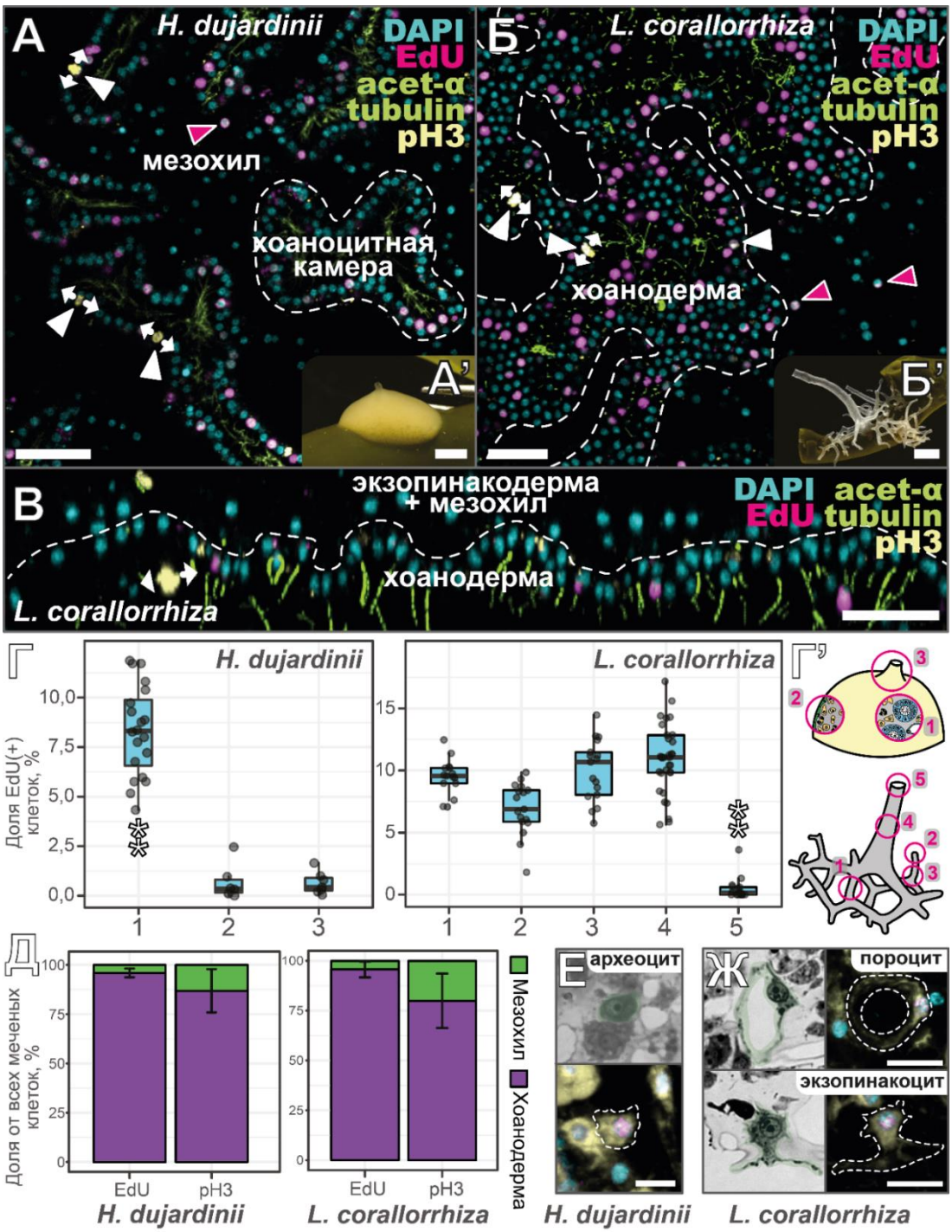


Рисунок 1. Пролиферация в интактных тканях *Halisarca dujardinii* и *Leucosolenia corallorrhiza*, КЛСМ. **А** – участок эндосомы *H. dujardinii*. **Б** – средняя часть оскулярной трубки *L. corallorrhiza*. **А'**, **Б'** – прижизненные фотографии объектов. **В** – XZ проекция стэка на Б. DAPI – клеточные ядра, EdU – ядра клеток в S-фазе, acet-α-tubulin – жгутики хоаноцитов, pH3 – клетки в M-фазе. **Г** – доля EdU(+) клеток в различных участках тела губок (схематически отражены на Г'; для *H. dujardinii* 1 – эндосома, 2 – эктосома, 3 – оскулярная трубка; для *L. corallorrhiza* 1 – трубки кормуса, 2 – дистальная часть дивертикул, 3 – проксимальная часть дивертикул, 4 – средняя часть оскулярной трубки, 5 – оскулярное кольцо). Астерисками отмечены статистически отличные от остальных участки тела. **Д** – анализ распределения меченых клеток между хоанодермой и мезохилом. **Е**, **Ж** – примеры пролиферирующих клеток вне хоанодермы. Масштаб: А, Б, В – 50 мкм; А', Б' – 2,5 мм; Е, Ж – 10 мкм. Адаптировано из Melnikov, Lavrov, 2023

Полученные данные позволили оценить общую длительность клеточного цикла хоаноцитов *H. dujardinii* в 52,0±21,0 ч, а у *L. corallorrhiza* – в 60,4±19,4 ч. Совмещение с данными проточной цитофлуориметрии о соотношении клеток в фазах S, G2/M и G0/G1 (Рисунок 2Д) позволило также оценить длительности индивидуальных фаз клеточного цикла.

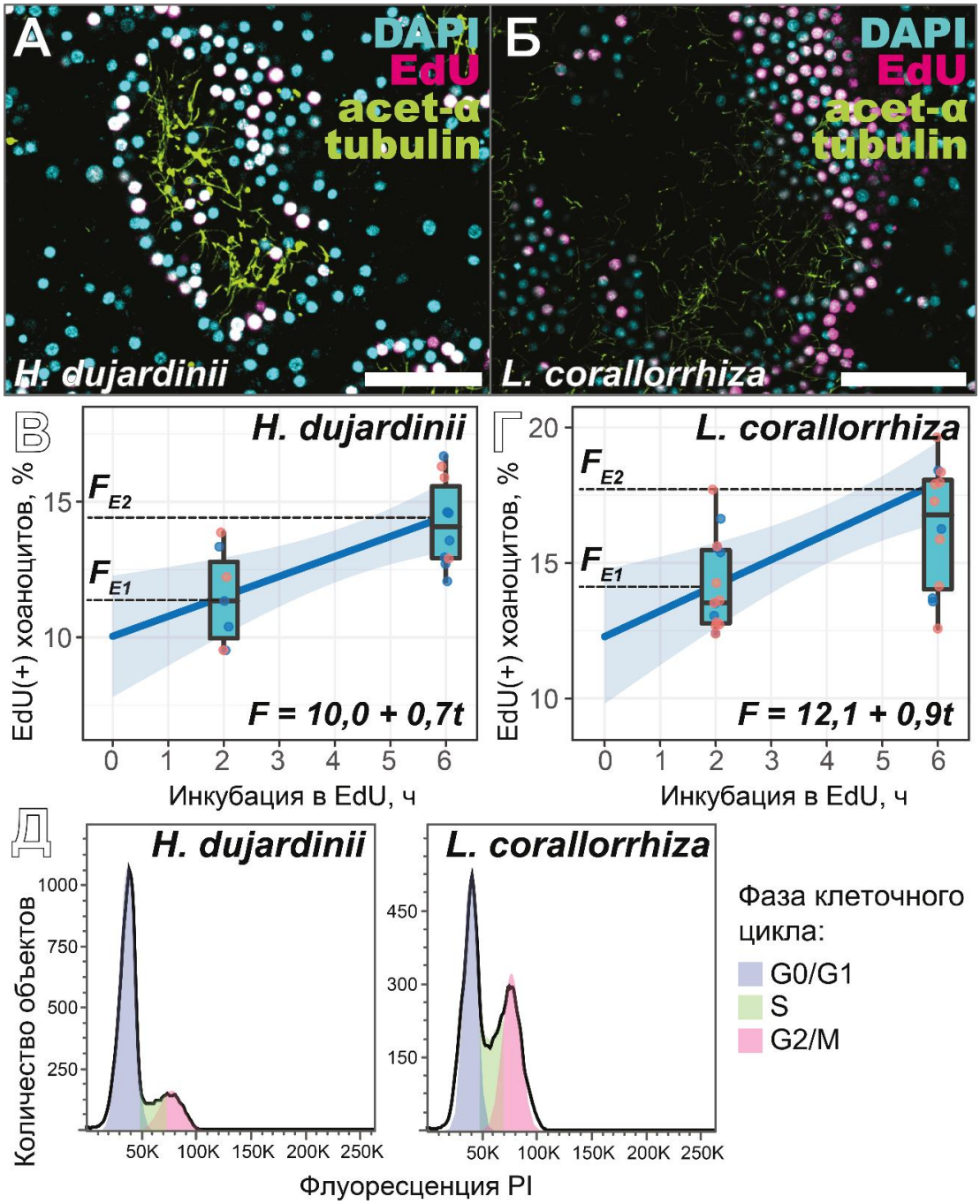


Рисунок 2. Анализ клеточного цикла хоаноцитов. **А**, **Б** – ткани губок после синхронизации клеток в S-фазе, КЛСМ; DAPI – клеточные ядра, EdU – ядра клеток в S-фазе, acet-α-tubulin – жгутики хоаноцитов. **В, Г** – накопление меченых хоаноцитов в зависимости от длительности инкубации в EdU; уравнения линейной регрессии приведены в правых нижних углах. **Д** – распределение клеток по содержанию ДНК на основе флуоресценции пропидий-йодида (PI). Масштаб: А, Б – 50 мкм. Адаптировано из Melnikov, Lavrov, 2023

Отслеживание потомков пролиферирующих клеток. Содержание губок после прекращения инкубации в EdU приводит к увеличению количества меченых клеток (Рисунок 3А, В). Основной вклад в накопление меченых клеток вносят хоаноциты.

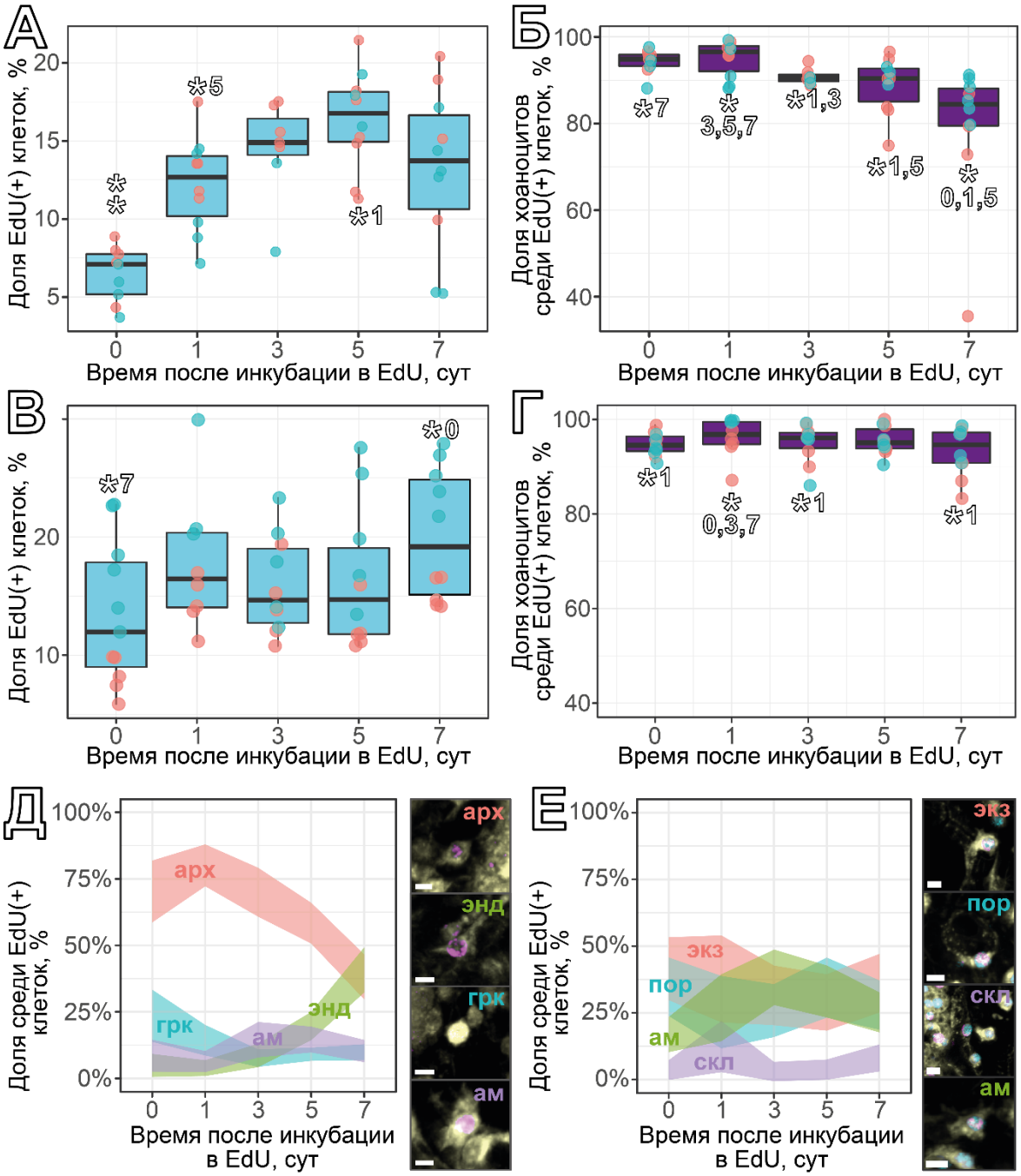


Рисунок 3. Отслеживание потомков пролиферирующих клеток в тканях *Halisarca dujardinii* и *Leucosolenia corallorrhiza* после прекращения инкубации в EdU. **А** – изменение общей доли меченых клеток у *H. dujardinii*. **Б** – изменение доли хоаноцитов среди меченых клеток у *H. dujardinii*. **В**, **Г** – то же для *L. corallorrhiza*. Астерисками отмечены точки, в сравнении с которыми наблюдаются статистически достоверные различия. **Д** – изменение состава EdU-положительных клеток вне хоаноцитных камер у *H. dujardinii* (95% доверительные интервалы; справа от графика приведены примеры меченых клеток). **Е** – то же для клеток вне хоанодермы *L. corallorrhiza*. Масштаб: Д, Е – 10 мкм

У *H. dujardinii* также происходит накопление меченых клеток в мезохиле (Рисунок 3Б); преимущественно они представлены археоцитами, но спустя трое суток наблюдается увеличение доли меченых эндопинакоцитов (Рисунок 3Д). У *L. corallorrhiza* значимого накопления меченых клеток мезохила/пинакодермы не выявлено, и соотношение клеточных типов вне хоанодермы не изменяется (Рисунок 3Г, Е).

Транскрипционный ландшафт репаративных процессов у губок. Реагрегация *H. dujardinii* (Рисунок 4А) и регенерация стенки тела *L. corallorrhiza* (Рисунок 5А) сопровождаются масштабными транскрипционными ответами, включающими в себя изменение экспрессии 7283 генов и 10118 транскриптов, соответственно.

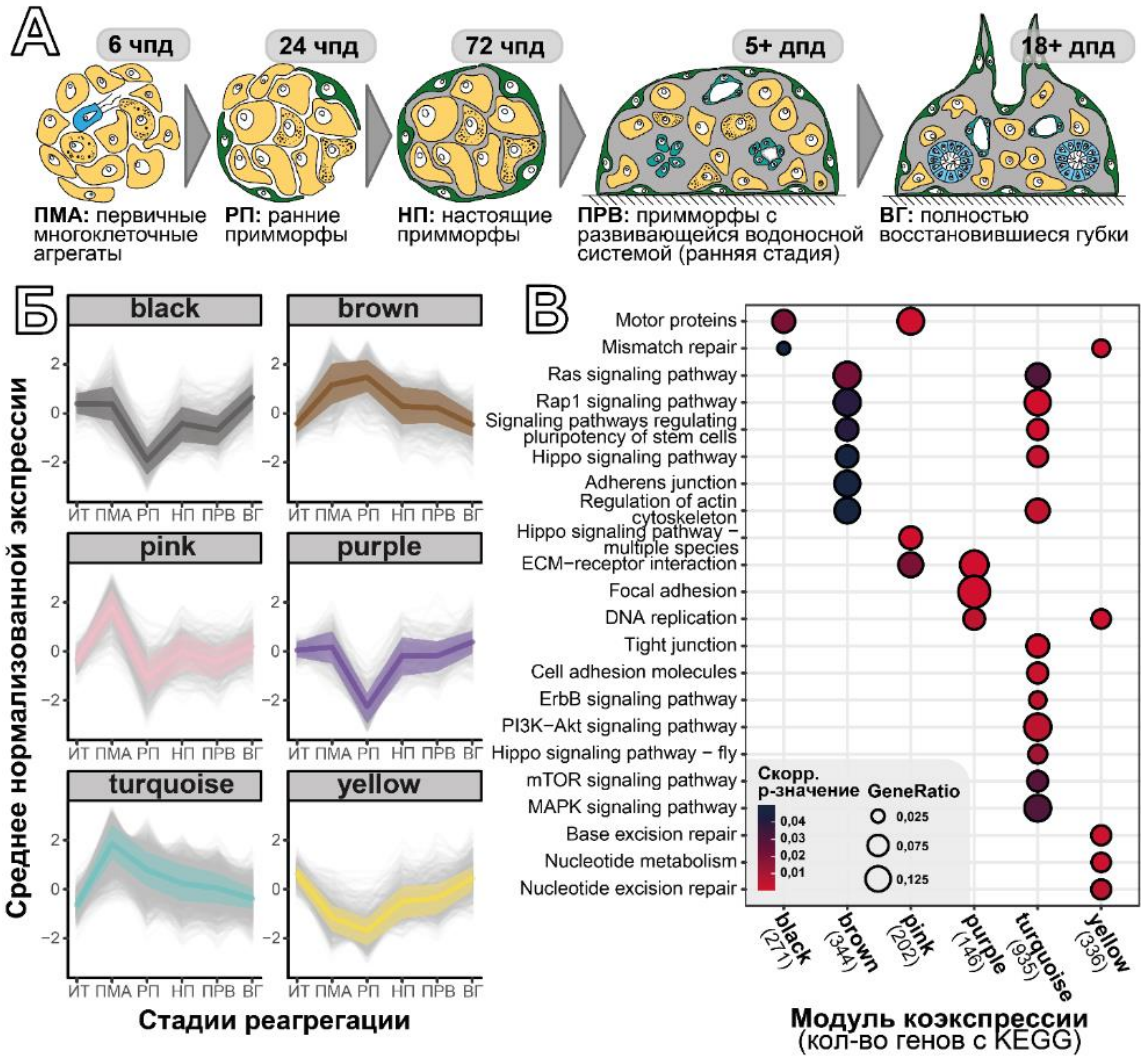


Рисунок 4. Транскрипционный ландшафт регенерации *Halisarca dujardinii*. **А** – исследованные стадии процесса. **Б** – профили экспрессии избранных модулей коэкспрессии. Серые линии – индивидуальные гены, цветные линии – средние значения для всех генов модулей, цветные области – межквартильный размах. **В** – результаты анализа обогащения модулей в терминах KEGG. Адаптировано из Ereskovsky et al., 2021 (А) и Melnikov et al, 2026 (Б, В)

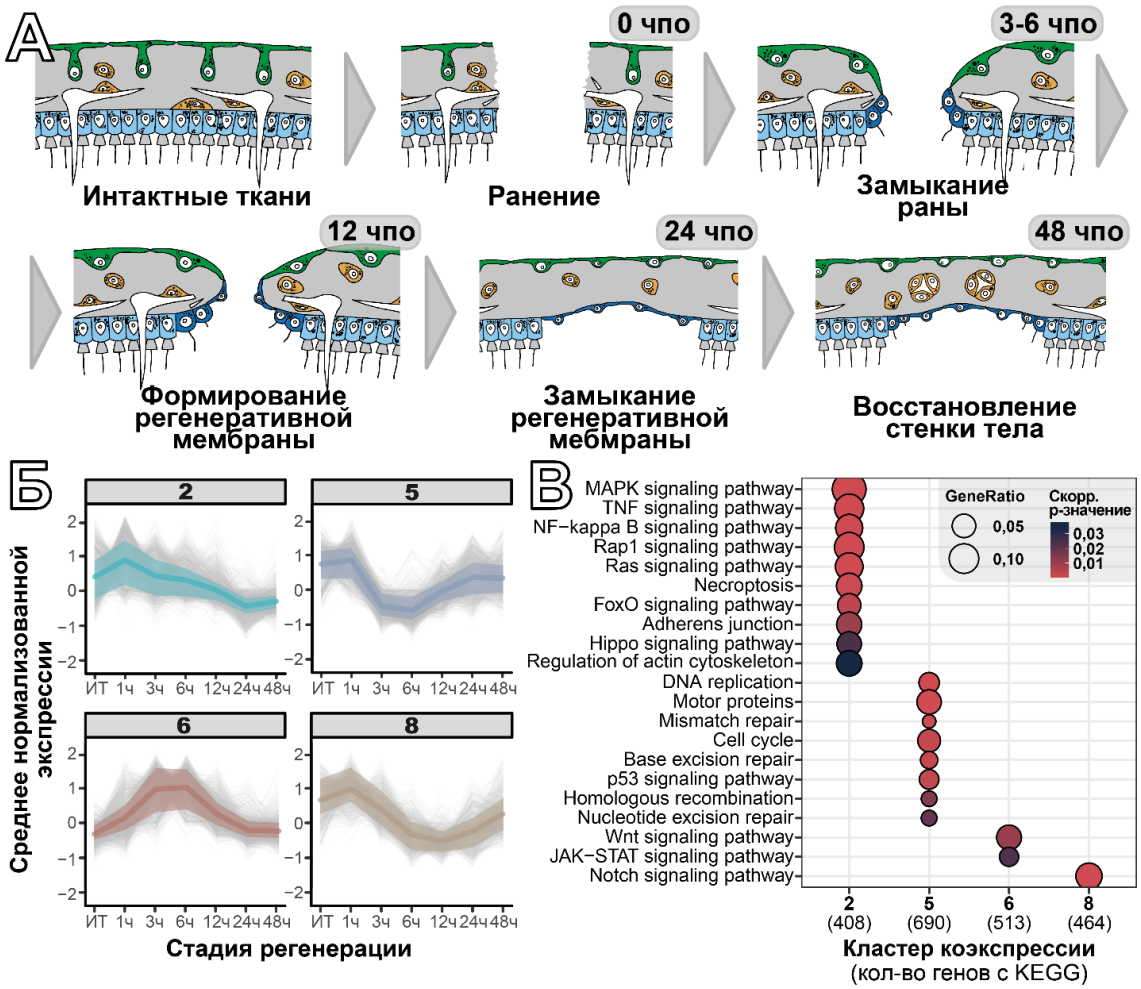


Рисунок 5. Транскрипционный ландшафт регенерации *Leucosolenia corallorrhiza*. **А** – исследованные стадии процесса. **Б** – профили экспрессии избранных кластеров коэкспрессии. Серые линии – индивидуальные гены, цветные линии – средние значения для всех генов кластеров, цветные области – межквартильный размах. **В** – результаты анализа обогащения кластеров в терминах KEGG. Схема на А адаптирована из Lavrov et al, 2018, с изменениями

Для обоих видов выявляется набор кластеров генов/транскриптов со схожими паттернами экспрессии (Рисунок 4Б; 5Б). Кластеры, связанные с клеточной адгезией, полярностью и сигнальными каскадами (Wnt, Notch, Hippo, TGF-β), активируются на ранних стадиях обоих процессов; кластеры, обогащенные в терминах репликации ДНК и клеточного цикла, демонстрируют сниженную экспрессию (Рисунок 4Б,В; 5Б,В).

Индукция клеточной гибели в интактных тканях губок. Индукция клеточной гибели подтвердила возможность активации эффекторных каспаз в клетках губок (Рисунок 6); зафиксированы также процессы общей дезорганизации тканей, фрагментации ДНК, деградации ядер (Рисунок 6Б-В) и формирования апоптотических телец (Рисунок 6Г). Интактные ткани исследуемых видов демонстрируют низкую активность клеточной гибели (Рисунок 6А).

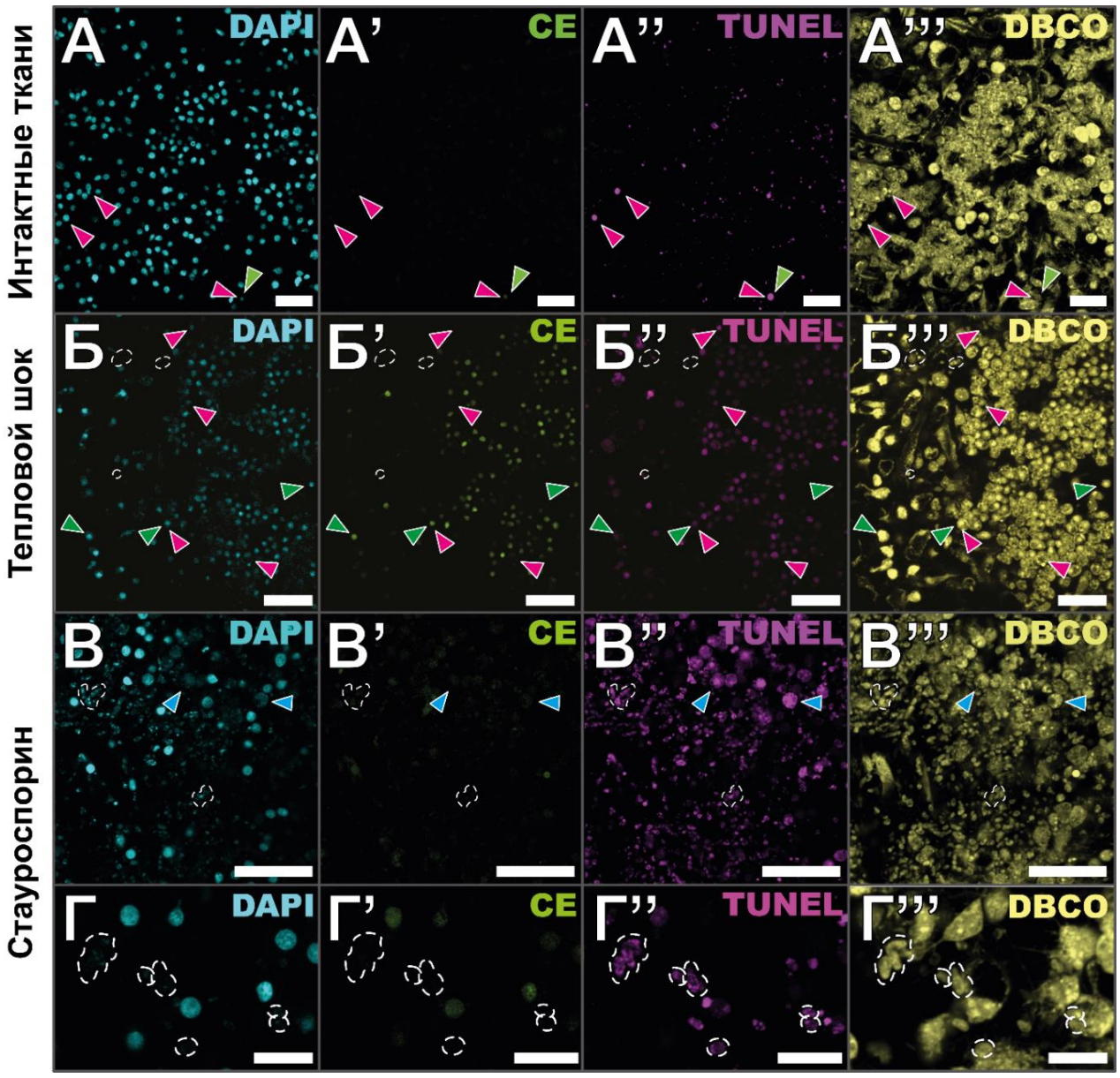


Рисунок 5. Особенности клеточной гибели у *Leucosolenia corallorrhiza*, КЛСМ. **А** – интактные ткани (средняя часть оскулярной трубки), **Б** – ткани после теплового шока, **В-Г** – ткани после инкубации в 1 мкМ стауроспорина (10 ч и 6 ч, соответственно). DAPI – клеточные ядра, CE – ядра клеток с активными эффекторными каспазами, TUNEL – ядра клеток с фрагментированной ДНК, DBCO – цитоплазма клеток. Пурпурные указатели маркируют TUNEL(+) ядра; зеленые указатели – CE(+) ядра; голубые клетки – клетки с деградирующими ядрами. Пунктирные линии отмечают положения некоторых апоптотических телец. Масштаб: А-В – 25 мкм, Г – 15 мкм

Ультраструктурная характеристика клеточной гибели у губок. Результаты электронной микроскопии подтвердили деградацию клеток при индукции клеточной гибели: тепловой шок и стауроспорин вызывают дезорганизацию тканей, конденсацию хроматина, кариолизис (Рисунок 7А), просветление цитоплазмы (Рисунок 7Г), блеббинг (Рисунок 7Б) и накопление апоптотических телец (Рисунок 7Д-Ж) при сохранении целостности клеточных мембран.

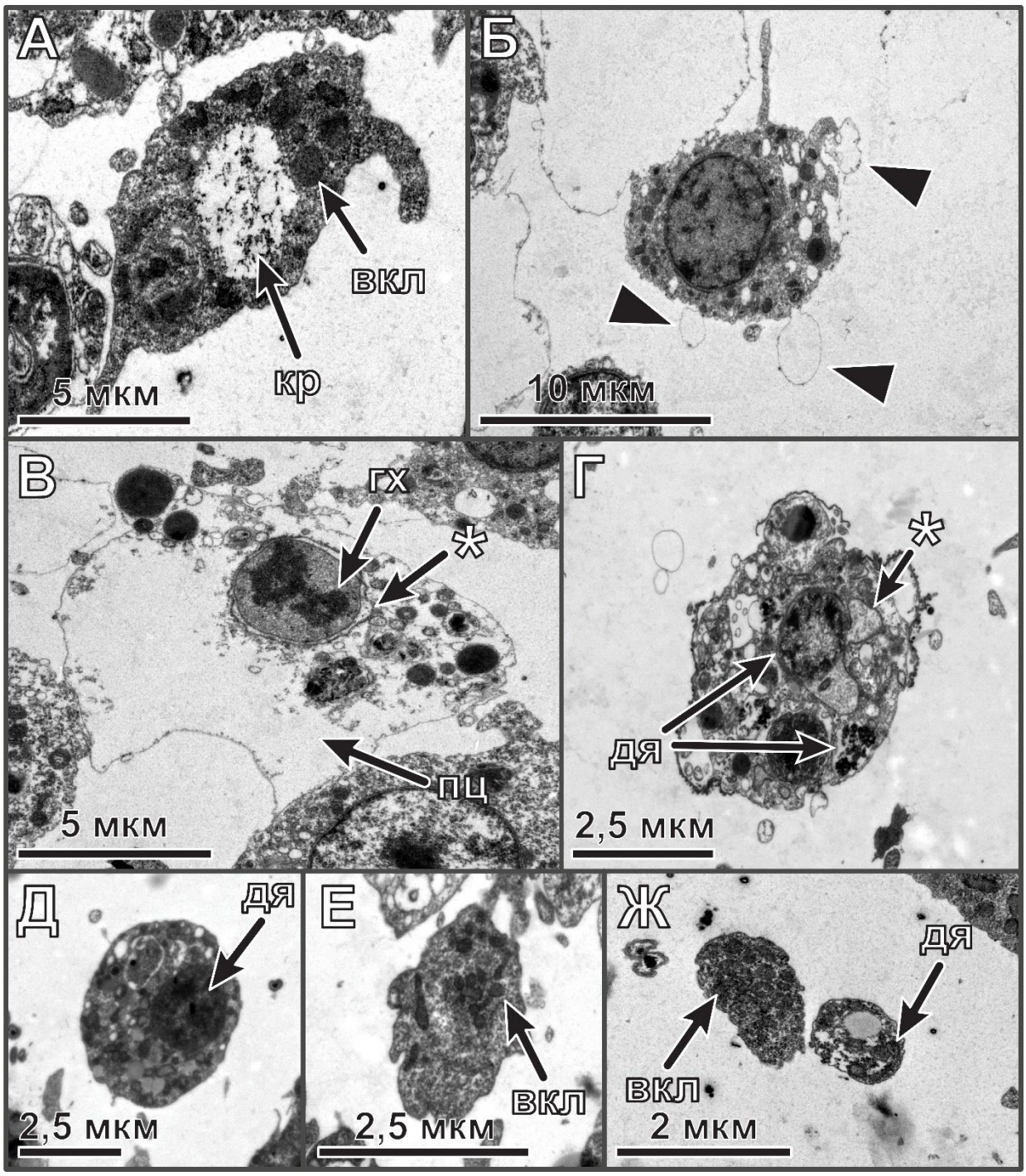


Рисунок 6. Морфологические черты клеточной гибели у *Halisarca dujardinii*, ТЭМ. **А**, **Б**, **В** – клетки после инкубации в 4 мкМ стауроспорина (10 ч, 6 ч и 6 ч, соответственно). **Г** – клетка после теплового шока. **Д-Ж** – различные варианты строения апоптотических телец. вкл – включения, дя – деградировавшие ядра, кр – кариолизис, пц – просветление цитоплазмы. Черные указатели маркируют блеббинг; стрелки с астерисками указывают на отслоение внешней мембраны ядра

***In silico* реконструкция апоптотического каскада.** Анализ геномов и транскриптомов шести видов Porifera из различных филогенетических линий (Demospongiae, Calcarea, Homoscleromorpha) выявляет наличие у губок ключевых участников апоптотического каскада: лигандов смерти и их

рецепторов, каспаз, членов семейства Bcl-2 и компонентов апоптосомы (Рисунок 8); описан также набор белков, предположительно участвующих в детекции нарушений ДНК или стресса ЭПР. Выявлены свидетельства потенциальных Porifera-специфичных актах экспансии белковых семейств Traf и каспаз. При этом у губок отсутствует ряд важных для апоптотического ответа у Eumetazoa адаптерных и регуляторных белков (Рисунок 8). Не свойственно губкам и наличие классических эффекторных каспаз: белки с характерной доменной структурой являются филогенетически более близкими к инициаторным каспазам с CARD-доменом.

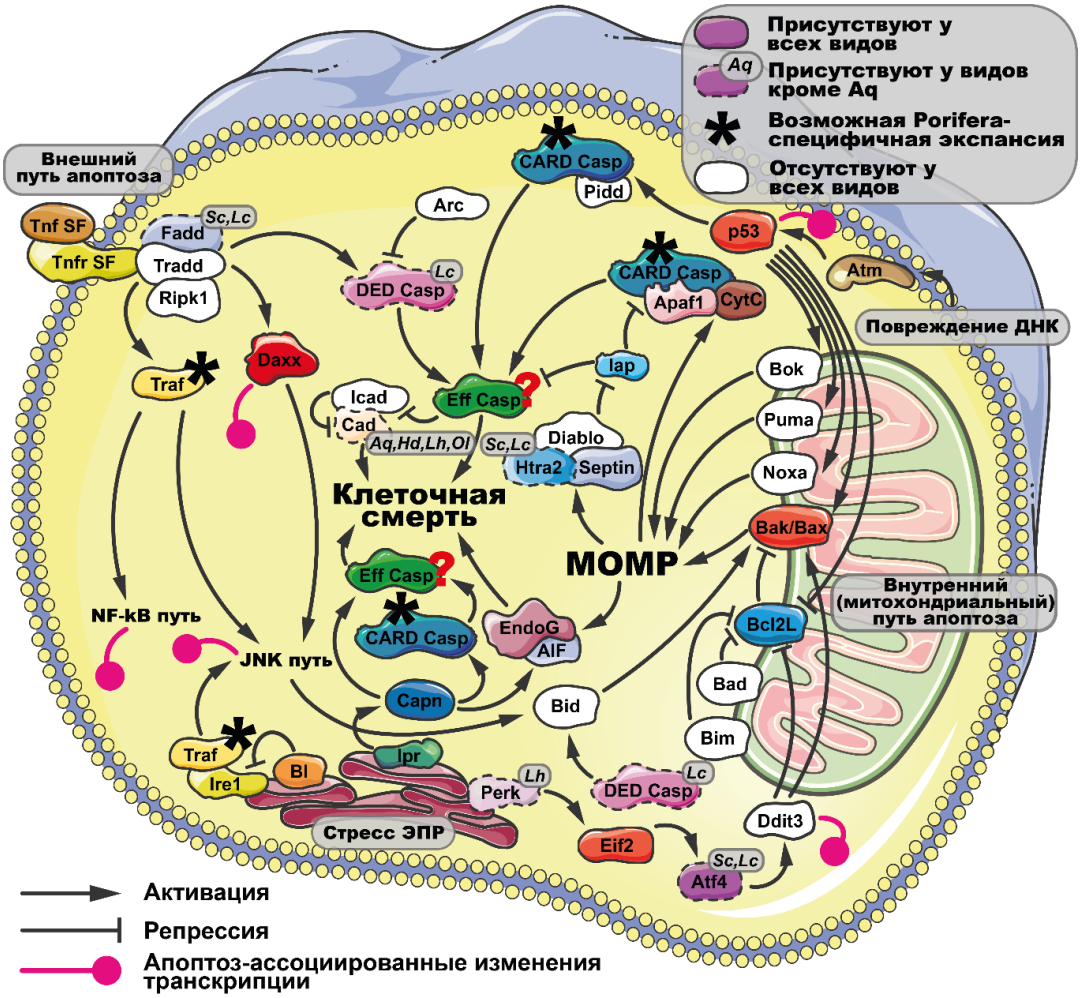


Рисунок 7. Общая структура апоптотического каскада у губок по результатам *in silico* поиска в геномных и транскриптомных базах данных представителей классов Demospongiae (*Halisarca dujardinii*, *Hd*; *Amphimedon queenslandica*, *Aq*; *Lycopodina hypogea*, *Lh*), Calcarea (*Leucosolenia corallorrhiza*, *Lc*; *Sycon ciliatum*, *Sc*) и Homoscleromorpha (*Oscarella lobularis, Ol*). Схема взаимодействия белков адаптирована из базы данных KEGG (https://www.kegg.jp/pathway/map04210). MOMP – пермеабилизация внешней мембраны митохондрий. CARD Casp – каспазы с CARD доменом; DED Casp – каспазы с DED-доменом; Eff Casp – каспазы с доменной структурой эффекторных каспаз; BCL2L – белки, подобные Bcl2/BclX/Mcl1; остальные белки названы в соответствии с базой данных UniProt. Эскизы белков и клеточных структур получены из NCBI BioArt (https://bioart.niaid.nih.gov/)

5. Обсуждение

Наблюдаемая в настоящей работе активность пролиферации в интактных тканях соответствует известным для других видов губок оценкам (Alexander et al., 2014; Kahn, Leys, 2016). Подобные значения характерны для пищедобывающих органов многих животных-фильтраторов, где высокая скорость возобновления обусловлена метаболической нагрузкой (Martínez-Expósito, Pasantes, Méndez, 1994; Shunatova, Borisenko, 2020; Strahl, Abele, 2010).

Совокупность данных свидетельствует в пользу того, что хоаноциты представляют собой общий для всех классов Porifera тип стволовых клеток (Alexander et al., 2014; Kahn, Leys, 2016). При этом губки демонстрируют разнообразие популяций пролиферирующих клеток вне водоносной системы (Funayama, 2018): у представителей классов Demospongiae и Hexactinellida они представлены археоцитами, в то время как для классов Homoscleromorpha и Calcarea пролиферация в мезохиле не характерна.

Хоаноциты *H. dujardinii* и *L. corallorrhiza* представляют собой асинхронную популяцию клеток, обладающих относительно длительным клеточным циклом; полученные оценки сопоставимы с таковыми для ССК других животных, но не соответствуют предполагавшейся ранее высокой скорости обновления хоаноцитов у губок (De Goeij et al., 2009). Наиболее вероятным объяснением несоответствия является использование в предыдущих работах математической модели Новаковски (Nowakowski, Lewin, Miller, 1989), не применимой в условиях симметричного деления хоаноцитов.

Как минимум у *H. dujardinii* потомки хоаноцитов могут участвовать в возобновлении и росте мезохила. Различия в судьбе потомков хоаноцитов у исследованных видов могут отражать особенности анатомо-гистологической организации: в случае лейконоидной *H. dujardinii* распределение нового клеточного материала невозможно без миграции потомков хоаноцитов в мезохил, в то время как асконоидная *L. corallorrhiza* с тонким и слабо развитым мезохилом может поддерживать возобновление и рост без выселения клеток из хоанодермы.

Сравнительный анализ реагрегации и регенерации указывает на общность механизмов: восстановление тканей у губок обеспечивается преимущественно репрограммированием и миграцией существующих клеток, а не пролиферацией – то есть, происходит по механизму морфаллаксиса. Наблюдаемая в этом случае пролиферация клеток является либо остаточной пролиферацией клеток, начавших клеточный цикл до нарушения тканевой структуры, либо – на поздних стадиях регенерации – маркирует собой

восстановление нормальных процессов возобновления тканей. На основании транскрипционной динамики предложено разделение реагрегации на фазы аналогично существующей модели регенерации по типу «заживление раны – морфогенез» у других Metazoa (Bideau et al., 2021; Tiozzo, Copley, 2015).

Индуцированная клеточная гибель у *H. dujardinii* и *L. corallorrhiza* сочетает признаки апоптоза (активацию эффекторных каспаз, формирование апоптотических телец, сохранение целостности мембраны) и непреднамеренной гибели – некроза (кариолизис, просветление цитоплазмы). Возможно, при индукции гибели процессы некроза и апоптоза происходят независимо друг от друга в различных клетках. В то же время существует вероятность, что для каспаз-опосредованной клеточной гибели у губок характерен ряд некротических черт.

При этом реконструкция апоптотического каскада у губок демонстрирует принципиальную возможность развития клеточной гибели по пути апоптоза: обнаружены компоненты внешнего и внутреннего пути инициации, комплексы пермеабилизации внутренней мембраны митохондрий, ряд регуляторов апоптотического ответа и широкий репертуар каспаз. Идентифицированный набор белков свидетельствует в пользу точки зрения, что апоптотический каскад является синапоморфией Metazoa (Green, Fitzgerald, 2016; Srivastava et al., 2010). При этом совокупность данных указывает на необходимость дальнейших исследований для валидации возможности применения термина «апоптоз» к каспаз-опосредованной клеточной гибели у губок.

III. Заключение

Настоящая работа – первое комплексное исследование механизмов клеточной пролиферации, репаративной регенерации и программируемой клеточной гибели у губок, выполненное на представителях разных филогенетических линий типа Porifera. Результатами работы стало не просто описание клеточных событий, но и характеристика молекулярных механизмов, лежащих в основе пролиферации, регенерации и клеточной гибели, с последующей интерпретацией полученных данных в широком эволюционном контексте. Настоящая работа открывает широкие перспективы для дальнейших исследований тканевой динамики *H. dujardinii* и *L. corallorrhiza*, зарекомендовавших себя в качестве многообещающих модельных объектов.

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что присутствие обширной популяции плюрипотентных клеток в мезохиле могло не быть характерным для общего предка Porifera. Сравнительный анализ транскрипционной динамики реагрегации и регенерации позволил

идентифицировать множество генов/транскриптов, задействованных в поддержании тканевого гомеостаза. Результаты анализа предоставляют новый взгляд на природу репаративных процессов у губок и, в частности, на роль в этих процессах клеточной пластичности.

Наконец, данные по функционированию и структуре апоптотического каскада у губок вносят существенный вклад в текущую дискуссию о консервативности механизмов клеточной гибели у Metazoa. Идентифицированный для губок набор предположительных белков-участников апоптоза служит дополнением к известным благодаря *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster* примерам эволюционной лабильности организации апоптотического каскада.

Выводы

1. Основным типом пролиферирующих клеток у *Halisarca dujardinii* и *Leucosolenia corallorrhiza* являются хоаноциты – жгутиковые клетки, обеспечивающие ток воды и фильтрацию пищевых частиц.

2. Хоаноциты *Halisarca dujardinii* и *Leucosolenia corallorrhiza* образуют крупную субпопуляцию асинхронных медленно пролиферирующих клеток, которая обеспечивает возобновление и рост пищедобывающих структур.

3. Исследованные виды губок демонстрируют различные принципы роста тканей. У *Halisarca dujardinii* роль хоаноцитов не ограничивается поддержанием гомеостаза хоаноцитных камер: для части потомков хоаноцитов характерно выселение в мезохил с приобретением археоцитоподобной морфологии и последующей дифференцировкой в другие типы клеток. В случае *Leucosolenia corallorrhiza* свидетельства об участии хоаноцитов в продукции новых клеток мезохила и пинакодермы отсутствуют.

4. Репаративная регенерация *Halisarca dujardinii* и *Leucosolenia corallorrhiza* сопровождается транскрипционной активацией программ поддержания стволовых клеток, клеточной пластичности, миграции и сигнальных каскадов Hippo, Wnt и TGF-β – и подавлением экспрессии машинерии клеточного цикла. Сумма наблюдений свидетельствует в пользу морфаллактического характера репаративной регенерации у исследуемых видов.

5. Индуцированная клеточная гибель в тканях *Halisarca dujardinii* и *Leucosolenia corallorrhiza* имеет смешанную природу, демонстрируя признаки и апоптоза, и некроза; в интактных тканях активность клеточной гибели низка.

6. Идентифицированный на уровне геномных/транскриптомных баз данных набор белков-участников апоптотического каскада у Porifera достаточен для обеспечения запрограммированной гибели клеток. Тем не менее, развитие каспаз-опосредованной клеточной гибели у губок может проходить по отличной от характерной для классического апоптоза схеме взаимодействий.

Благодарности

Автор выражает особую благодарность научному руководителю работы – к.б.н. Лаврову А.И. за придание исследованию столь необходимого начального импульса, энтузиазм в поддержке развития новых направлений работы и помощь на протяжении всего научного пути. Также автор считает необходимым отметить неоценимую помощь к.б.н. Косевича И.А. в обсуждении и улучшении работы.

Автор также хочет выразить отдельные благодарности:

- Всему научному коллективу под руководством Лаврова А.И. – и, в частности, Скоренцевой К.В., Большакову Ф.В., Фоминой М.А., Зелениной А.И. – за поддержание здоровой и творческой рабочей атмосферы;
- Коллегам-спонгиологам Ересковскому А.В. и Борисенко И.Е. – за плодотворные дискуссии, обмен опытом и данными;
- Цетлину А.Б. и всем сотрудникам Беломорской Биологической Станции МГУ – за организацию комфортной и эффективной научной работы;
- Поташниковой Д.М. и Саидовой А.А. – за помощь в получении данных проточной цитофлуориметрии и обсуждении работы;
- Краус Ю.А. и Воронежской Е.Е. – за возможность получения данных для *Lycopodina hypogea*;
- Королевой А.С. и Гринбергу М.Г. – за обмен практиками анализа биоинформатических данных;
- Шринивасу Бхаттипролу (Sreenivas Bhattiprolu) – за вдохновение к изучению Python и методов анализа микроскопических снимков;
- Коллективам кафедры зоологии беспозвоночных МГУ и Межкафедральной лаборатории электронной микроскопии МГУ – за возможность проведения микроскопических исследований;
- Сотрудникам котлопункта Беломорской Биологической Станции – за поддержание физического и морального здоровья научных сотрудников;
- Воробьевой О.А., Домбровской А.А., Глобчуку Д.В., Шнягину А.М., Богомолову А.И., Никитенко Е.Д. – за незабываемую компанию и неоценимую поддержку на этом пути;
- Абу – за вклад в поддержание здорового режима сна на Беломорской Биологической Станции МГУ.

Работа выполнена при поддержке грантов РНФ № 23-74-10005, РФФИ № 19-04-00545 А и 21-54-15006НЦНИ_а и гранта Президента РФ № 075-15-2021-213.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности и отрасли наук

1. **Melnikov N.P.**, Bolshakov F.V., Frolova V.S., Skorentseva K.V., Ereskovsky A.V., Saidova A.A., Lavrov A.I. Tissue homeostasis in sponges: quantitative analysis of cell proliferation and apoptosis // Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution. – 2022. – Vol. 338. – № 6. – pp. 360-381. EDN: DLFJAD. Импакт-фактор 0,978 (SJR). (2,1 п.л./1,6 п.л.)

2. **Melnikov N.P.,** Lavrov A.I. Cell cycle dynamics of food-entrapping cells of sponges: an experimental approach // The FEBS Journal. – 2024. – Vol. 291. – № 11. – pp. 2405-2422. EDN: SEWPBK. Импакт-фактор 2,042 (SJR). (1,7 п.л./1,4 п.л.)

3. Ereskovsky A.V., **Melnikov N.P.**, Lavrov A.I. Archaeocytes in sponges: simple cells of complicated fate // Biological Reviews. – 2025. – Vol. 100. – № 2. – pp. 790-814. EDN: BHNKQV. Импакт-фактор 4,609 (SJR). (3,4 п.л./1 п.л.)

4. Lavrov A.I., **Melnikov N.P.**, Bolshakov F.V., Saidov D.M., Le Goff E., Skorentseva K.V., Frolova V.S., Ereskovsky A.V. Cell proliferation and cell death during whole-body regeneration in the demosponge *Halisarca dujardinii* // FEBS Letters. – 2025. – Vol. 599. – № 12. – pp. 1698-1716. EDN: KIMSPC. Импакт-фактор 1,181 (SJR). (0,9 п.л./0,2 п.л.)

5. **Melnikov N.P.**, Skorentseva K.V., Ereskovsky A.V., Borisenko I.E., Bolshakov F.V., Lavrov A.I. Tissue integrity at the root of Metazoa – transcriptional landscape of whole-body regeneration in sponges // The FEBS Journal. – 2026. – Vol. 293. – № 5. – pp. 1516-1544. EDN: ZDBUEC. Импакт-фактор 2,042 (SJR). (2,6 п.л./2 п.л.)

6. Skorentseva K.V., **Melnikov N.P.**, Ereskovsky A.V., Lavrov A.I., Saidova A.A. Validating the classics: accurate reference gene panel for reliable RT-qPCR in Porifera // PLOS One. – 2026. – Vol. 21. – № 5. – P. e0349507. DOI: 10.1371/journal.pone.0349507. Импакт-фактор 0,726 (SJR). (1,6 п.л./0,4 п.л.)

7. Bolshakov F.V., **Melnikov N.P.**, Skorentseva K.V., Koroleva A.S., Borisenko I.E., Ereskovsky A.V., Lavrov A.I. Structure, transcriptional signature, and regeneration of oscular rim in calcareous sponge *Leucosolenia corallorrhiza* // Invertebrate Zoology. – 2026. – Vol. 23. – № 3. – pp. 367-392. EDN: ISXNLN. Импакт-фактор 0,414 (SJR). (2,1 п.л./0,6 п.л.)