ОНТОГЕНЕЗ, 2014, том 45, № 4, с. 250–271

ОБЗОРЫ

УДК 593.4:591.39

РЕАГРЕГАЦИЯ КЛЕТОК ГУБОК: МЕХАНИЗМЫ И ДИНАМИКА ПРОЦЕССА

© 2014 г. А. И. Лавров, И. А. Косевич

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова
119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
E-mail: lavrovai.bio@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.08.13 г.
Окончательный вариант получен 20.02.14 г.

Губки (Porifera) – низшие многоклеточные животные, характерной чертой организации которых является высокая пластичность их анатомических и клеточных структур. Одна из форм проявления этой пластичности – способность клеток губок к реагрегации после диссоциации тканей животного. Настоящий обзор объединяет имеющиеся данные о реагрегации клеток губок, которые были получены в период с начала XX века по настоящее время. В нем рассматривается поведение диссоциированных клеток в суспензии, механизмы и факторы, участвующие в реагрегации, темп и этапы этого процесса у разных представителей типа. Также представлены сведения о гистологическом строении многоклеточных агрегатов, формирующихся в ходе реагрегации клеток, и о восстановительных морфогенезах, приводящих к формированию полноценных губок из этих многоклеточных агрегатов.

Ключевые слова: губки, реагрегация клеток, примморфы, восстановительные морфогенезы.

DOI: 10.7868/S0475145014040077

ВВЕДЕНИЕ

Проблема происхождения и ранней эволюции многоклеточных животных является одной из важнейших в современной биологии. Многоклеточность не могла возникнуть без появления механизмов координации клеточных делений, дифференцировок и программируемой гибели, а также межклеточной адгезии и узнавания. Эволюция этих механизмов обеспечивала все более устойчивую интеграцию отдельных клеток в единые соподчиненные структуры, что в конечном итоге привело к переходу от одноклеточных организмов, через колониальные формы, к настоящим многоклеточным животным. К настоящему моменту получено множество данных о поведении клеток, механизмах их интеграции и коммуникации в составе интактных тканей, во время эмбрионального развития, а также в ходе восстановительных морфогенезов у большого числа беспозвоночных и позвоночных животных. Результаты исследований позволили выявить общие закономерности функционирования тканей многоклеточных животных и высказать предположения относительно процессов, происходивших на ранних этапах становления многоклеточности (Tyler, 2003; Srivastava et al., 2010; Adamska et al., 2011). Тем не менее, в данной области остается множество нерешенных проблем. Для дальнейшего прогресса в решении этой проблемы представляется перспективным подробное изучение механизмов интеграции и коммуникации клеток в составе тканей низших многоклеточных животных, в частности у представителей типа Porifera (губки).

Губки – это водные прикрепленные многоклеточные животные с фильтрационным питанием и дыханием. Во взрослом состоянии губки имеют очень примитивную организацию – у них отсутствуют какие-либо органы, пищеварительная, нервная и мышечная системы. Наиболее характерной чертой организации губок является их водоносная система. Она представляет собой сеть каналов, пронизывающих все тело животного и соединяющих хоаноцитные камеры, выстланные воротничковыми клетками, несущими жгутики – хоаноцитами. Вода попадает в водоносную систему через множество мелких отверстий на поверхности губки – остий, и выбрасывается через одно или несколько крупных отверстий – оскулюмов (рис. 1).

Посредством водоносной системы губка прокачивает через свое тело огромные объемы воды, из которой получает необходимые для жизни питание и кислород. За счет постоянного биения жгутиков хоаноциты создают ток воды, проходя-

щий через тело животного. Хоаноциты также обеспечивают питание губки – большая часть пищевых частиц захватывается из воды именно этими клетками. Каналы водоносной системы и внешняя поверхность тела губок покрыты слоем уплощенных или Т-образных клеток – пинакоцитов.

Весь объем тела между каналами, камерами водоносной системой и внешней поверхностью губки занимает так называемый мезохил. Хотя мощность мезохила сильно варьирует в разных группах губок, у всех представителей типа Porifera в его состав входит большое количество подвижных типов клеток, различающихся по строению и функциям (археоциты, склероциты, колленциты и др.), и рассеянных в обводненном внеклеточном матриксе (основном веществе мезохила) (Ересковский, 2005). Также в мезохиле располагается скелет животного, состоящий из органических (тяжи спонгина) и неорганических (известковые или кремневые спикулы) элементов (рис. 1).

Долгое время губок считали самостоятельной ветвью животных, возникшей независимо от Metazoa. При этом многие исследователи характеризовали губок как животных, находящихся между одноклеточными организмами и настоящими многоклеточными животными (Hadzi, 1963; цит. по Ересковский, 2005). Причиной этому служили особенности строения тела губок и сходство хоаноцитов с одноклеточными или колониальными протистами хоанофлагеллятами (Adamska et al., 2011).

С развитием методов молекулярной биологии стало очевидным, что губки и настоящие многоклеточные животные (Eumetazoa) образуют единую монофилетическую группу (рис. 2). Публикации последних лет на эту тему указывают не только на монофилию губок и Eumetazoa, но и на базальное положение губок в кладе многоклеточных животных (Srivastava et al., 2008, 2010; Pick et al., 2010). Более того, есть основания предполагать, что Porifera – это единственный ныне существующий тип животных, близкий к гипотетическому предку многоклеточных животных (Müller, 2001). В связи с этим невозможно обсуждать вопросы появления и ранней эволюции многоклеточных животных, не принимая во внимание губок.

Монофилия губок и Eumetazoa позволяет предположить, что молекулярные механизмы, обеспечивающие функционирование тканей, коммуникацию и интеграцию клеток, а также протекание морфогенезов у губок сходны с таковыми у высших многоклеточных животных. К настоящему времени, в геноме губок обнаружены гены многих классов транскрипционных факторов (ANTP, PRD, POU, LIM, SIX, Sox, nuclear receptor (NR), Fox, T-box, Mef2, Ets, IRO) и элементов основных сигнальных путей (Wnt, TGF-β, Notch, Hedgehog), которые характерны для представителей высших многоклеточных (Larroux et al., 2006; Srivastava et al., 2010; Ereskovsky et al., 2013).

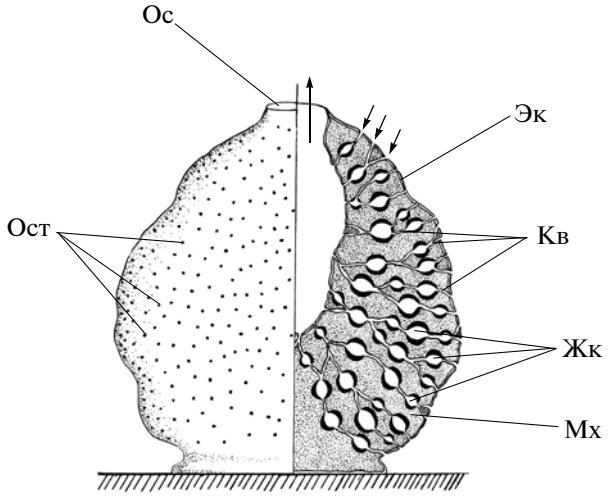

Рис. 1. Схема организации взрослой особи губки (по: Лавров, Косевич, 2013). Жк – хоаноцитные камеры, Кв – каналы водоносной системы, Мх – мезохил, Ос – оскулюм, Ост – остии, Эк – пинакодерма. Стрелки на схеме показывают направление токов воды через водоносную систему.

Вместе с тем, в организации губок присутствуют черты, абсолютно нехарактерные для других многоклеточных животных. Уникальной чертой организации взрослых губок можно считать мобильность и пластичность их анатомических и клеточных структур. В отличие от других многоклеточных животных на пост-эмбриональных стадиях, у которых активные клеточные движения и дифференцировки связаны, преимущественно, с процессами формирования структурных и функциональных элементов организма или восстановительными морфогенезами, в теле губок абсолютно все клетки находятся в процессе постоянного перемещения и трансдифференцировки. Это приводит к непрерывной реорганизации основных анатомических структур тела животного – водоносной системы и скелета. Высокая лабильность всех структур в теле губок позволяет им быстро и адекватно реагировать на изменяющиеся гидродинамические условия окружающей среды (Bond, 1992; Ересковский, 2005).

Одной из форм проявления описанной выше пластичности является способность клеток губок к реагрегации после диссоциации тканей животного химическими или механическими методами. Впервые процесс реагрегации клеток губок

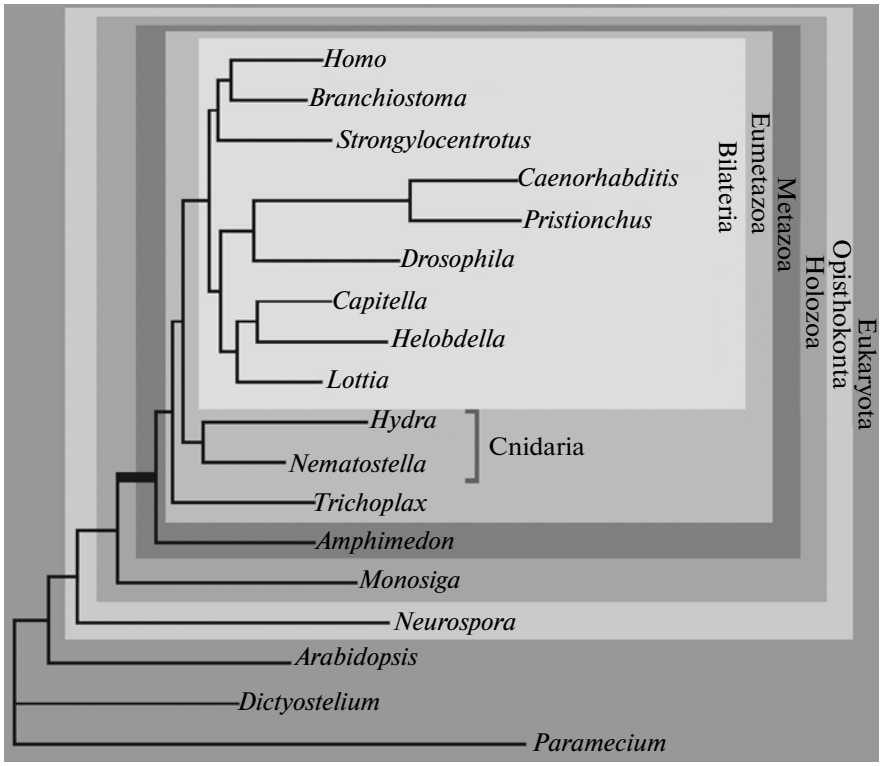

Рис. 2. Филогенетическое дерево многоклеточных животных, построенное методом Баейса на основании 229 ядерных белок-кодирующих генов. Все клады имеют статистическую поддержку в виде постериорной вероятности равной 1 (по: Srivastava et al., 2010).

был описан Вилсоном в 1907 г. (Wilson, 1907) и с тех пор стал предметом исследования многих авторов. Изучались как морфологическая сторона процесса, так и вопросы, связанные с межклеточными взаимодействиями, дедифференцировкой и трансдифференцировкой различных типов клеток (Ефремова, 1969; Волкова, Золоторева, 1981). В ходе процесса реагрегации происходит формирование многоклеточных агрегатов разнообразного строения, а в некоторых случаях и полное восстановление организации губки (Wilson, 1907; Huxley, 1912; Galtsoff, 1925b; Короткова, 1972). Особой стадией этого процесса является формирование так называемых примморфов. Примморфы представляют собой трехмерные клеточные агрегаты сферической формы. Они характеризуются наличием непрерывной пинакодермы, отделяющей внутреннюю массу неспециализированных клеток от окружающей среды. Примморфы – это завершение процесса реагрегации клеток. После их окончательного формирования при определенных условиях могут начаться процессы регенерации и роста губки (Custudio et al., 1998; Müller et al., 1999). Долговременные культуры примморфов в настоящее время рассматриваются как потенциальная система для получения биологически активных веществ из губок (Osinga, 1999; Müller et al., 2000; Pomponi, 2006).

Цель данного обзора – обобщить имеющиеся к настоящему времени данные, касающиеся различных аспектов процесса реагрегации клеток губок. В нем будут проанализированы поведение клеток при реагрегации, динамика формирования и структура формирующихся клеточных агрегатов, механизмы и факторы, определяющие реагрегацию клеток, а также процессы, приводящие к восстановлению интактной организации животного.

ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК НА РАННИХ ЭТАПАХ РЕАГРЕГАЦИИ

Для получения суспензии клеток используют два основных метода диссоциации тканей губок – химический или механический. В случае механической диссоциации ткани животного протирают через мелкий мельничный газ, что приводит к их механическому разделению на отдельные клетки и небольшие группы клеток (Wilson, 1907; Ефремова, 1969). При химической диссоциации ткани губки помещают в безкальциевую и безмагниевую воду с хелатирующим компанентом (ЭДТА), что приводит к нарушению межклеточных контактов и разделению тканей на отдельные клетки

(Humphreys, 1963; Custudio et al., 1998; Müller et al., 1999). Концентрированные суспензии клеток помещают в чашки Петри, получая, таким образом, временные культуры клеток, в которых будет происходить процесс реагрегации.

Процесс реагрегации начинается в суспензии клеток непосредственно после ее получения (если суспензия была получена химическим методом, то реагрегация начинается только после перенесения клеток в среду, содержащую ионы Ca^{2+} и Mg^{2+}). В суспензии изолированные клетки быстро приобретают округлую форму. Исключение составляют хоаноциты, которые некоторое время сохраняют жгутик и воротничок микроворсинок. Клетки начинают образовывать псевдоподии, число, размер и форма которых сильно варьируют (Galtsoff, 1923; Ефремова, Дроздов, 1970; Ефремова, 1972; Короткова, 1972; Волкова, Золотарева, 1981). В некоторых случаях было показано, что псевдоподии формируют только определенные типы клеток (амебоциты), тогда как другие типы (хоаноциты и/или пинакоциты) не обладают этой способностью (Короткова, 1972) или обладают в меньшей степени (Ефремова, Дроздов, 1970; Ефремова, 1972; Короткова, 1997).

После оседания на субстрат из толщи суспензии и формирования псевдоподий, клетки большинства видов губок приобретают амебоидную подвижность. Вилсон, работавший на морской губке *Clathria prolifera* (Ellis & Solander, 1786) из кл. Demospongiae, указывает, что амебоидной подвижностью обладают все типы клеток данного вида, хотя не проводил детального наблюдения за поведением клеток в суспензии (Wilson, 1907). Более подробные наблюдения за поведением клеток *C. prolifera* в суспензии были проведены Гальцовым (Galtsoff, 1923, 1925a). Гальцов выделял в суспензии три типа клеток – археоциты, покровные клетки (вероятно, пинакоциты) и хоаноциты. По его наблюдениям амебоидной подвижностью обладали только археоциты и покровные клетки (при этом археоциты перемещались более активно), а хоаноциты могли двигаться только некоторое время за счет биения жгутика. Сходные данные о поведение клеток в суспензии были получены для пресноводных губок *Ephydatia fluviatilis* (Linnaeus, 1759) и *Spongilla lacustris* Linnaeus, 1759 (Языков, 1965; Ефремова, Дроздов, 1970; Ефремова, 1972). Данные о способности к амебоидному движению только некоторых типов клеток (амебоцитов) были получены также для двух представителей кл. Calcarea – *Leucosolenia complicata* (Montagu, 1818) и *Sycon lingua* (Haeckel, 1870) (Короткова, 1972; Giano et al., 1985).

Наблюдения за миграцией клеток *C. prolifera* (Galtsoff, 1923) и *Clathrina* sp. (Giano et al., 1985) показали, что перемещение клеток происходит в случайном направлении, т.е. клетки не мигрируют целенаправленно одна к другой или в направлении большой группы клеток. В ходе миграции клетки часто меняют направление и скорость перемещения. При встрече в ходе миграции клетки агрегируют и формируют небольшие группы, которые также сохраняют подвижность. Судя по всему, у данных видов губок реагрегация клеток происходит в основном за счет случайных встреч подвижных клеток или групп клеток (Wilson, 1907; Galtosoff, 1923, 1925a; Giano, Burlando, 1990).

Для ряда видов морских Demospongiae (*Halisarca dujardini* Johnston, 1842, *Haliclona aquaeductus* (Schmidt, 1862) и *Halichondria panicea* (Pallas, 1766)) описан иной механизм реагрегации. Клетки данных видов губок в суспензии округляются и образуют псевдоподии, но не проявляют амебоидной активности. Клетки используют псевдоподии для обследования пространства вокруг себя. Только при контакте псевдоподий клетки подтягиваются друг к другу (Волкова, Золотарева, 1981; Лавров, Косевич 2013).

Тем не менее, существуют данные о способности клеток *H. panicea* к активному амебоидному движению в суспензии (Языков, 1965), а тщательные наблюдения за клетками *E. fluviatilis* в суспензии выявили “смешанный” характер их поведения – большинство клеток образует псевдоподии для активного перемещения по субстрату, но часть клеток производит псевдоподиями только “поисковые” движения вокруг себя (Ефремова, Дроздов, 1970; Ефремова, 1972). Возможно, характер поведения диссоциированных клеток губок является не видоспецифичным явлением, а в большей степени зависит от условий постановки эксперимента и физиологического состояния особи губки, из которой была получена суспензия.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕАГРЕГАЦИИ КЛЕТОК

На молекулярном уровне реагрегация клеток губок происходит при участии внеклеточного макромолекулярного комплекса – фактора агрегации. Исследования на электронном и атомно-силовом микроскопах показали, что факторы агрегации *C. prolifera* и *Geodia cydonium* (Jameson, 1811) имеют форму розетки: в ее центре находится ядро комплекса – кольцевая молекула гликозилированного белка диаметром 100–130 нм, от которой расходятся 16–25 линейных молекул белков, соединенных с ядром посредством ковалентных и нековалентных связей (Fernandez-Busquets, Burger, 1999; Müller, Müller, 2003) (рис. 3а). Факторы агрегации *Halichondria bowerbanki* Burton, 1930, *Suberites aurantiacus* (Duchassaing & Michelotti,

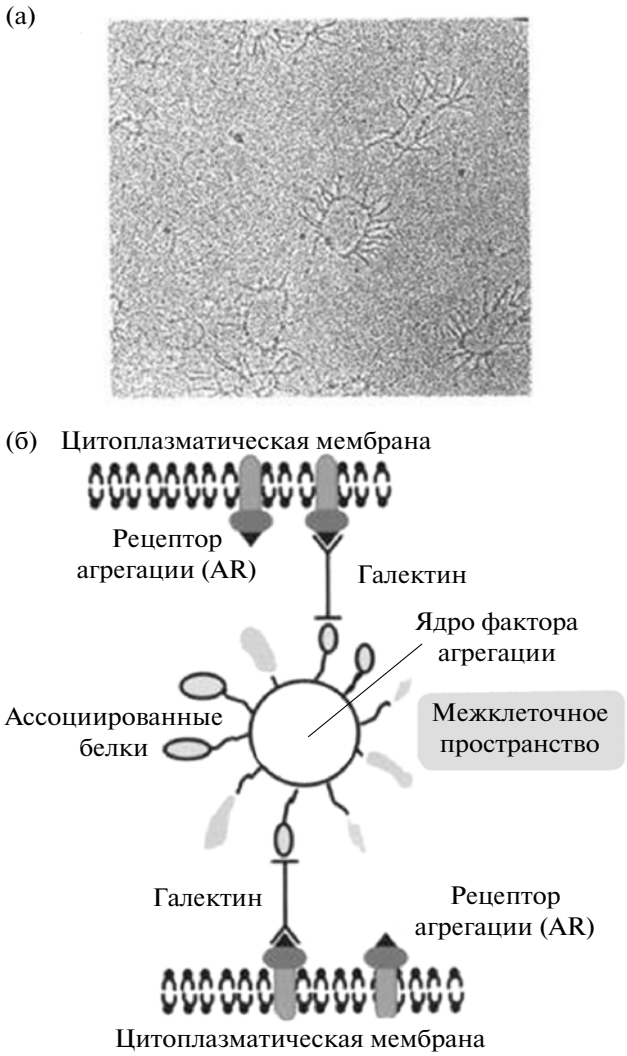

Рис. 3. Фактор агрегации клеток (AF) губок (по: Müller, Müller, 2003). а – электронно-микроскопическая фотография фактора агрегации *Geodia cydonium* (Jameson, 1811). Видно ядро комплекса и 25 ассоциированных с ним белков (ТЭМ, увеличение ×70000); б – схема взаимодействия клеток губки посредством фактора агрегации.

1864) и *Haliclona oculata* (Pallas, 1766) имеют сходные размеры и структуру, но ядром комплекса является линейная молекула (Fernandez-Busquets, Burger, 1999). Фактор агрегации переходит в раствор при диссоциации интактных тканей губки. При реагрегации клеток он действует как своеобразный мостик, который соединяет соседние клетки, взаимодействуя с трансмембранным белком – рецептором агрегации, что приводит к объединению этих клеток. В экспериментах с суспензиями клеток *C. prolifera* и *H. oculata* было продемонстрировано, что по мере реагрегации концентрация свободного фактора агрегации в среде падает, поскольку он связывается с поверхностями клеток (Moscona, 1968). Процесс реагрегации клеток посредством фактора агрегации является двухступенчатым и включает в себя Ca^{2+}-зависимый и Ca^{2+}-независимый этапы. Поэтому для эффективной работы фактору агрегации необходимо наличие в среде ионов Ca^{2+} и Mg^{2+}, а также полипептида галектина (Короткова, 1997; Spiegel, 1954; Humphreys, 1963; Popescu, Misevic, 1997; Fernandez-Busquets, Burger, 1999; Müller, Müller, 2003; Ereskovsky, 2007) (рис. 3б).

Начальная концентрация фактора агрегации в среде влияет на степень реагрегации клеток губки: повышение его концентрации ведет к формированию более крупных агрегатов, понижение – к уменьшению размеров агрегатов или отсутствию агрегации (Humphreys, 1963; Moscona, 1968; Leith, 1979). Для протекания процесса реагрегации клетки губки необязательно должны

быть метаболически активными. В присутствие фактора агрегации возможна реагреагация клеток, предварительно зафиксированных глютаровым или формалиновым альдегидом (Moscona, 1968; Leith, 1979), или реагрегация при низких температурах, когда метаболизм клеток блокирован (Humphreys, 1970; Popecsu, Misevic, 1997; Fernandez-Busquets, Burger, 1999). Однако в отсутствии самого фактора агрегации или при его блокировании (иммунной сывороткой или поликлональными антителами) реагрегация клеток не происходить (Spiegel, 1954; Humphreys, 1963; Popecsu, Misevic, 1997; Fernandez-Busquets, Burger, 1999).

ВИДОВАЯ И ИНДИВИДУАЛЬНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РЕАГРЕГАЦИИ КЛЕТОК

Для ряда видов губок известно, что в ходе процесса реагрегация их клетки проявляют способность к *видоспецифичной* агрегации. В этом случае при смешивании суспензий клеток, полученных от двух разных видов губок, реагрегация происходит только между клетками и клеточными агрегатами одного вида. Клетки разных видов не реагрегируют, даже если они искусственно сближены посредством центрифугирования (Wilson, 1910; Galtsoff, 1923, 1925a; Curtis, 1962; Humphreys, 1963, 1970; Fernandez-Busquets, Burger, 1999).

Эксперименты Хамфриса (Humphreys, 1963, 1970) со смешанной суспензией клеток *C. prolifera* и *H. oculata* показали, что для данных видов характерна высокая видоспецифичность реагрегации, и в культурах никогда не формируются смешанные агрегаты. При удалении из смешанной суспензий клеток факторов агрегации обоих видов реагрегации клеток не происходит. Если после этого к суспензии добавить фактор агрегации одного из видов, то происходит формирование агрегатов из клеток только этого вида. Сходные эксперименты были проведены Шпигелем (Spiegel, 1954) на смешанной суспензии клеток *C. prolifera* и *Cliona celata* Grant, 1826, для которых также характерна высокая видоспецифичность реагрегации. Однако в своих экспериментах Шпигель не удалял факторы агрегации из смешанной суспензии клеток, а блокировал их с помощью иммунных сывороток. Добавление иммунной сыворотки против фактора агрегации одного из видов останавливало реагрегацию только клеток этого вида, никак не влияя на процесс реагрегации клеток другого вида.

Эти данные, а также результаты аналогичных экспериментов других исследователей (Moscona, 1968; Leith, 1979), указывали на видоспецифичный характер действия фактора агрегации и позволяли сделать предположение о его участии в процессе видоспецифичной реагрегации клеток губок. Эти предположения были полностью подтверждены в экспериментах с цветными синтетическими гранулами, которые были соединены с факторами агрегации трех видов губок (*C. prolifera*, *H. panicea* и *C. celata*). При наличии в среде ионов Ca^{2+} в этой экспериментальной системе происходит видоспецифичная агрегация гранул, что однозначно указывает на центральную роль фактора агрегации в процессе видоспецифичной реагрегации клеток губок (Popescu, Misevic, 1997; Fernandez-Busquets, Burger, 1999; Fernandez-Busquets, 2008).

Тем не менее, в ряде экспериментов со смешанными суспензиями клеток не происходит полного разделения клеток разных видов, и формируются смешанные агрегаты различного строения (Curtis, 1962; Humphreys, 1970; Leith, 1979). Это указывает на то, что, по крайней мере, у некоторых губок видоспецифичность реагрегации выражена не так ярко. Кертису (Curtis, 1962) в экспериментах с несколькими видами губок удалось наблюдать весь спектр возможных результатов реагреации смешанной суспензии клеток – от полного разделения клеток разных видов до формирования агрегатов, в которых клетки двух видов были случайно перемешаны. При этом полное разделение клеток двух видов губок происходило, если темп реагрегации у этих видов сильно различался. В случае сходного темпа реагрегации в смешанной суспензии двух видов формировались смешанные агрегаты. Эти данные позволяют предположить, что видовая специфичность реагрегации клеток определяется не только видоспецифичностью действия фактора агрегации, но и временнòй компонентой.

На разных клональных линиях пресноводной губки *E. fluviatilis* было показано, что реагрегирующие клетки проявляют не только видовую специфичность, но и *индивидуальную*. При смешивании суспензий клеток, полученных из представителей разных клональных линий, на ранних этапах реагрегации формируются смешанные агрегаты. Но в течение нескольких суток в этих агрегатах происходит сортировка клеток, которая приводит к полному разделению клеток, принадлежащих разным линиям. То есть формируются агрегаты, состоящие из клеток только одного индивидуума (Van de Vyver, 1975; Fernandez-Busquets, Burger, 1999). Индивидуальная специфичность сохраняется и при смешивании клеточных фракций, которые состоят только из одного типа клеток (De Sutter, Van de Vyver, 1979; Fernandez-Busquets, Burger, 1999).

Хотя до сих пор неясно, какой механизм лежит в основе индивидуальной специфичности и гистосовместимости у губок, некоторые факты ука-

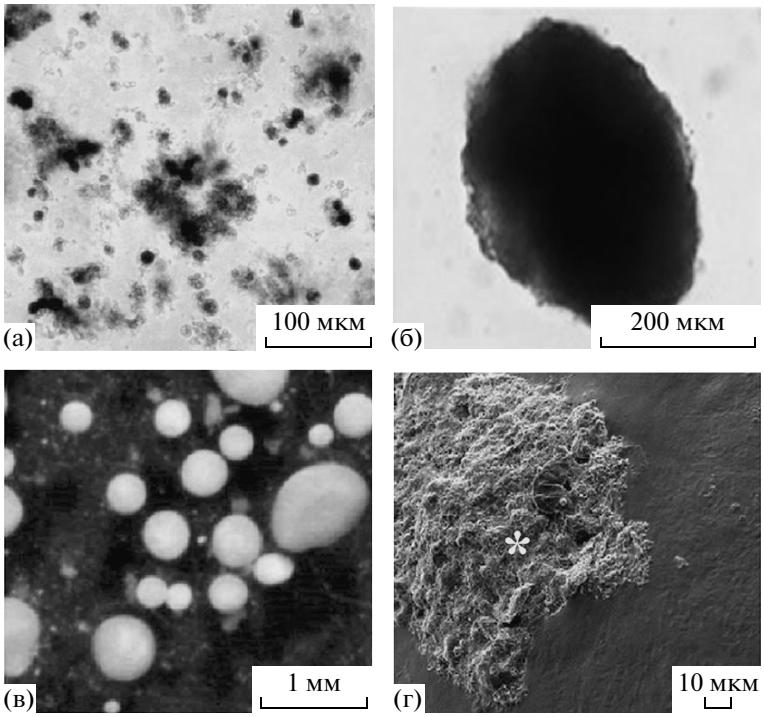

Рис. 4. Основные этапы реагрегации клеток губок в лабораторных условиях. а – клеточные агрегаты аморфной формы *S. massa*, 15 мин (по: Sipkema et al., 2003); б – ранний примморф *L. baicalensis*, 6 часов (по: Chernogor et al., 2011a); в – настоящие примморфы *S. massa*, 7 сут (по: Sipkema et al., 2003); г – область выделения детрита и мертвых клеток (отмечена звездочкой) на поверхности примморфа *S. domuncula* (по: Sipkema et al., 2003).

зывают на участие в этом процессе фактора агрегации. (1) В упомянутых выше экспериментах на *E. fluviatilis* было показано, что добавление в среду фактора агрегации одной из клональных линий вызывает усиленную реагрегацию клеток только своей линии и подавляет этот процесс у клеток других линий (Van de Vyver, 1975). (2) Исследования значительного количества особей *C. prolifera* показали, что каждая особь имеет разный набор генов, кодирующих белки MAFp3 и MAFp4, которые формируют ядро в молекуле фактора агрегации. Индивидуальная вариабельность наблюдается и на уровне углеводов, входящих в состав фактора агрегации. Такой высокий внутривидовой полиморфизм характерен для молекулярных систем, участвующих в аллогенном распознавании у высших многоклеточных животных (Fernandez-Busquets, Burger, 1997,1999; Fernandez-Busquets et al., 1998; Fernandez-Busquets, 2008). (3) В экспериментах по аллогенной трансплантации на *C. prolifera* было показано накопление мРНК MAFp3, а также самого белка в клетках на границе тканей донора и реципиента (Fernandez-Busquets et al., 1998, 2002).

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ РЕАГРЕГАЦИИ КЛЕТОК

Процесс реагрегации клеток губок изучали на представителях двух классов: Demospongiae и Calcarea. Однако на известковых губках было проведено лишь небольшое количество исследований (Huxley, 1912; Короткова, 1972). Было показано, что на ранних этапах скорость реагрегации клеток отличается у представителей Demospongiae и Calcarea. Так, первые *клеточные агрегаты*, состоящие из 15–30 клеток, у *L. complicata* и *S. lingua* (кл. Calcarea) образуются только через 2–3 ч после начала реагрегации, а у губок класса Demospongiae агрегаты такого же размера формируются уже через 15–40 мин. Во всех случаях первые клеточные агрегаты имеют небольшие размеры и неправильную форму (рис. 4а). В дальнейшем происходит увеличение их размеров за счет слияния агрегатов друг с другом, а также за счет дальнейшего присоединения к ним отдельных клеток из суспензии. Через 2–4 ч клеточные агрегаты представителей класса Demospongiae достигают размеров сотен микрометров (в некоторых случаях 1–1.5 мм), в то время, как у губок из кл. Calcarea для достижения тех же размеров агрегатам требуется 12–24 ч (Короткова, 1972;

Sipkema et al., 2003; Zhang et al., 2003a; Chernogor et al., 2011), что, возможно, связано с меньшей амебоидной подвижностью клеток в суспензии.

На 2–3-е сутки в культурах появляются агрегаты, имеющие округлую форму и неровную поверхность (рис. 4б). Данную стадию реагрегации можно охарактеризовать как *ранние примморфы*, которые постепенно преобразуются в настоящие *примморфы* (рис. 4в). Процесс преобразования ранних примморфов сопровождается уплотнением клеточных агрегатов и формированием на их поверхности сплошного слоя экзопинакодермы (первые этапы формирования экзопинакодермы в некоторых случаях наблюдаются спустя несколько часов после начала реагрегации) (Müller et al., 1999; Sipkema et al., 2003; Zhang et al., 2003a; Chernogor et al., 2011) (рис. 7б). В процессе преобразования первичных клеточных агрегатов в примморфы вокруг них часто образуется зона, в которой лежат детрит, мертвые клетки и спикулы, вероятно, выделяемые самими агрегатами (Müller et al., 1999; Sipkema et al., 2003; Лавров, Косевич, 2013) (рис. 4г). Кроме того, в это время в клеточных агрегатах может происходить синтез полисахаридов и коллагена *de novo,* как это показано для *Hymeniacidon heliophila* (Parker, 1910). Синтез полисахаридов у клеточных агрегатов этого вида наиболее активен в первые сутки реагрегации и падает практически до нуля к моменту формирования примморфов (4–5 сут). По мнению авторов, эти результаты указывают на важную роль полисахаридов в клеточной адгезии у губок, в частности, на ранних этапах реагрегации клеток (Vilanova et al., 2010). Изменения интенсивности синтеза коллагена в ходе развития агрегатов пока не изучены.

Исследование ряда видов средиземноморских губок, относящихся к классу Demospongiae, показало, что у 14 видов примморфы формируются на 3–7-е сут, у 5 видов – на 8–20-е сут, у 1 вида – на 35–40-е сут и у еще 8 видов примморфы не формируются – агрегация доходит только до стадии клеточных агрегатов (таблица) (Sipkema et al., 2003; Valisano et al., 2006a). Время формирования примморфов сильно варьирует у разных видов, в основном за счет различий в скорости преобразования ранних примморфов в настоящие примморфы (Sipkema et al., 2003). Сильно варьирует и время существования примморфов разных видов губок в культуре – от 6 дней до 10 мес. (Müller et al., 1999; Sipkema et al., 2003; Valisano et al., 2006a; Chernogor et al., 2011a) (таблица). Среди причин того, что у некоторых видов губок реагрегация клеток не приводит к формированию примморфов, называются анатомические и экологические особенности данных видов. Предполагается, что губки рода *Cliona* формированию примморф может препятствовать седиментарный материал, накапливающийся в хоаноцитных камерах губки в результате сверлящей активности, а в случае *Aplysina aerophoba* формированию примморфов препятствует огромное количество симбиотических бактерий (Valisano et al., 2006a). Однако четкого обоснования этих предположений в работе не приводится.

Валисано с коллегами (Valisano et al., 2006a), проводившие исследования процесса реагрегации на ряде видов средиземноморских губок, указывают, что примморфы, получаемые от разных видов губок, различаются по форме, размеру и общему числу в культуре, даже если для их формирования используют один и тот же объем тканей. При этом не наблюдается корелляции между закономерностями формирования примморфов и таксономическим положением губки. Подобные выводы выглядят не совсем корректными, так как реальное влияние на динамику процесса реагрегации оказывает не столько объем используемых тканей, сколько концентрация клеток в суспензии, получаемой после диссоциации этих тканей. К сожалению, в своей статье авторы не указывают концентрации клеток в используемых суспензиях. Вместе с тем, авторы предполагают, что различия в количестве и размерах примморфов могут быть объяснены различным “поведением” примморфов после их окончательного формирования: 1) примморфы сливаются, при этом их количество уменьшается, а размеры увеличиваются; 2) примморфы дробятся, и их количество увеличивается, а размеры уменьшаются (Valisano et al., 2006a). Все эти данные и рассуждения говорят в пользу существования нескольких путей реагрегации клеток губок.

В целом динамику реагрегации клеток можно представить следующим образом (Valisano et al., 2006a) (рис. 5):

1. Диссоциированные клетки;
2. Клеточные агрегаты;
3. Примморфы:
3.1. Медленное формирование;
3.2. Быстрое формирование:
3.2.1. Короткоживущая культура;
3.2.2. Долгоживущая культура:
3.2.2.1. Дробление – количество примморфов увеличивается, их размеры уменьшаются;
3.2.2.2. Слияние – количество примморфов уменьшается, их размеры увеличиваются.

Совершенно особый тип реагрегации был продемонстрирован на губке *Dysidea avara* (Schmidt, 1862). После образования настоящих примморфов реагрегация продолжилась – на 10-е сут культивирования примморфы начали сливаться, об-

Время формирования и существования в культуре примморфов разных видов губок (по: Sipkema et al., 2003, Valisano et al., 2006a, Chernogor et al., 2011 с дополнениями)

Вид губки	Время формирования примморфов, сутки	Время существования примморфов в культуре	Источник
Acanthella acuta Schmidt, 1862	3	27 дней	Valisano et al., 2006a
Agelas oroides (Schmidt, 1864)	15	27 дней	Valisano et al., 2006a
Aplysma aerophoba Nardo, 1833	–	–	Valisano et al., 2006a
Axinella damicornis (Esper, 1794)	3	27 дней	Valisano et al., 2006a
Axinella polypoides Schmidt, 1862	35–40	>5 месяцев	Sipkema et al., 2003
Axinyssa aurantiaca (Schmidt, 1864)	3	9 дней	Valisano et al., 2006a
Batzella inops (Topsent, 1891)	3	27 дней	Valisano et al., 2006a
Chondrilla nucula Schmidt, 1862	–	–	Valisano et al., 2006a
Chondrosia reniformis Nardo, 1847	–	–	Valisano et al., 2006a
Clathria prolifera (Ellis & Solander, 1786)	1–2	вг (6–20 суток)	Wilson, 1907 Galtsoff, 1925b
Cliona celata Grant, 1826	3	6 дней	Valisano et al., 2006a
Cliona nigricans (Schmidt, 1862)	–	–	Valisano et al., 2006a
Corticium candelabrum Schmidt, 1862	–	–	Valisano et al., 2006a
Dysidea avara (Schmidt, 1862)	3	27 дней	Valisano et al., 2006a
Ephydatia fluviatilis (Linnaeus, 1759)	1	вг (6–7 суток)	Ефремова, 1969
Geodia cydonium (Jameson, 1811)	7–10	>2 месяцев	Sipkema et al., 2003
Halichondria panicea (Pallas, 1766)	3–20	1–5 месяцев	Короткова, 1972
		вг (25–30 суток)	Sipkema et al., 2003 Лавров, Косевич, 2013
Haliclona aquaeductus (Shmidt, 1862)	5–8	1–2 месяца	Лавров, Косевич, 2013
Haliclona fulva (Topsent, 1893)	3	27 дней	Valisano et al., 2006a
Haliclona oculata (Pallas, 1766)	18	18 дней	Sipkema et al., 2003
Halisarca dujardini Johnston 1842	2–3	вг (20–25 суток)	Волкова, Золотарева, 1981 Кутерницкая и др., 2008
Hemimycale columella (Bowerbank, 1847)	3	15 дней	Valisano et al., 2006a
Hymeniacidon agminata Ridley, 1884	5–7	н/о	Zhang et al., 2003a
Hymeniacidon perlevis (Montagu, 1818)	5	н/о	Zhang et al., 2003b
Hymeniacidon heliophila (Parker, 1910)	4–5	н/о	Vilanova et al., 2010
Ircinia oros (Schmidt, 1864)	–	–	Valisano et al., 2006a
Leucosolenia complicata (Montagu, 1818)	5–6	вг (3 недели)	Короткова, 1972
Lubomirskia baicalensis (Pallas, 1766)	2	10 месяцев	Chernogor et al., 2011
Petrosia ficiformis (Poiret, 1789)	3	27 дней	Valisano et al., 2006a
Phorbas fictitious (Bowerbank, 1866)	3	15 дней	Valisano et al., 2006a
Pleraplysilla spinifera (Schulze, 1879)	3	27 дней	Valisano et al., 2006a
Pseudosuberites aff. andrewsi	4–8	9 дней	Sipkema et al., 2003
Spirastrella cunctatrix Schmidt, 1868	3	27 дней	Valisano et al., 2006a
Spongia officinalis Linnaeus, 1759	–	–	Valisano et al., 2006a
Stylissa massa (Carter, 1887)	7–10	>2 месяцев	Sipkema et al., 2003
Suberites domuncula (Olivi, 1792)	3–7	4–5 месяцев	Custudio et al., 1998 Valisano et al., 2006a
Sycon lingua (Haeckel, 1870)	2–3	вг (4 недели)	Короткова, 1972
Sycon raphanus Schmidt, 1862	5	вг (17–30 суток)	Huxley, 1912

Прочерк – в проведенных экспериментах примморфы не формировались; н/о – время жизни примморфов в культурах не определялось; вг – в культурах примморфов происходит восстановление функциональных особей губок, в скобках указано время полного восстановления особи.

Рис. 5. Общая схема процесса реагрегации клеток губок в лабораторных условиях (по: Valisano et al., 2006а).

разуя сеть, которая прикреплялась ко дну чашки Петри (рис. 6). Эта сеть достигла размеров 10–30 × × 5–20 мм, при толщине "столонов" ~50 мкм и размерах пор ~150 мкм (Müller et al., 2000). К сожалению, дальнейшая судьба данного типа агрегатов не была прослежена.

ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ АГРЕГАТОВ И ПРИММОРФОВ

Клеточные агрегаты, формирующиеся в первые часы после диссоциации, включают все типы клеток, присутствовавших в суспензии. На начальной стадии клетки в составе агрегатов упакованы неплотно. Форма клеток близка к округлой, реже они образуют цитоплазматические отростки для взаимодействия с соседними клетками. Часть клеток содержит в своей цитоплазме фагосомы. Клетки, располагающиеся на поверхности клеточных агрегатов, не отличаются по морфологии от клеток, лежащих глубже (рис. 7а). В состав агрегатов также могут входить обломки спикул, тяжи спонгина, симбиотические бактерии и одноклеточные водоросли, которые присутствовали в тканях материнской губки (Ефремова, 1969; Короткова, 1972; Волкова, Золотарева, 1981; Chernogor et al., 2011). Остается непонятным, что позволяет клеткам держаться вместе: обычные методы фиксации для электронной микроскопии не выявляют никакого внеклеточного матрикса, а видимых точек контактов между клетками явно недостаточно.

Во время преобразования клеточных агрегатов в примморфы происходит изменение их строения. В основном изменения касаются поверхностного слоя клеток: эти клетки приобретают уплощенную или Т-образную форму, и постепенно формируют непрерывный слой экзопинакодермы на поверхности примморфа (рис. 7б, 7в). В это время также меняется распределение волокон коллагена внутри агрегата. У первичных клеточных агрегатов возрастом 24 ч волокна коллагена немногочисленны и распределены случайным образом. Но к моменту формирования примморфов коллагеновые фибриллы заполняют межклеточное пространство, а на поверхности примморфов образуют сплошной слой, который, вероятно, обеспечивает механическую поддержку слою экзопинакоцитов (Vilanova et al., 2010). На поверхности примморфов *E. fluviatilis*, в отличие от других видов губок, формируется двойной слой пинакоцитов, который в некоторых местах отделяется от внутренней массы клеток и образует гиподермальные полости (Ефремова, 1969).

Постепенно клетки внутренней массы примморфов приобретают довольно плотную упаковку. Они характеризуются амебоидной формой, и большинство из них может быть определено как амебо- и археоциты. Реже во внутренней массе

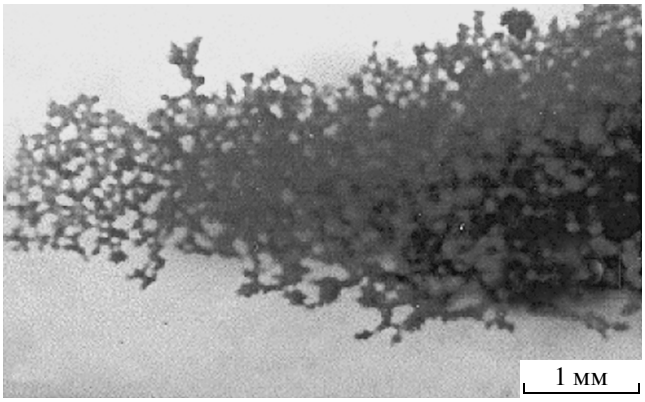

Рис. 6. Прикрепленные сетчатые примморфы *D. avara*, 10 суток (по: Müller et al., 2000).

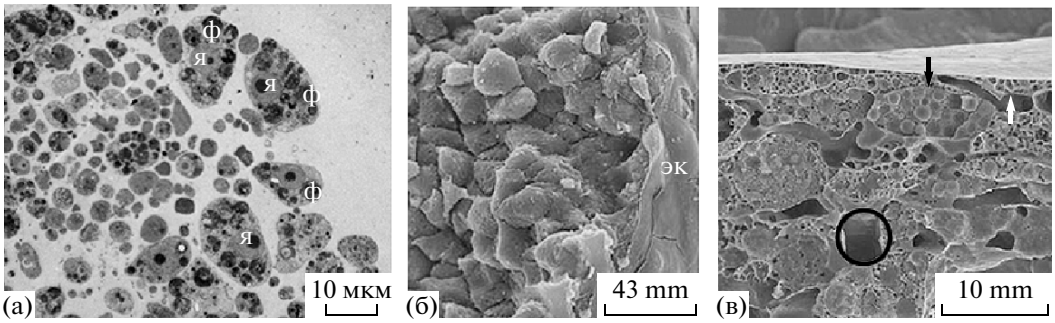

Рис. 7. Гистологическое строение клеточных агрегатов и примморфов губок. а – срез клеточного агрегата *H. panicea*, 72 ч (я – ядра клеток, ф – фагосомы) (ТЭМ) (по: Лавров, Косевич, 2013); б – наружная часть примморфа *L. baicalensis*, 19 суток (СЭМ) (по: Chernogor et al., 2011a); в – скол примморфа *S. massa*, 7 сут (белая стрелка – пинакоцит, черная стрелка – гранулоцит, черный круг – межклеточное пространство) (СЭМ) (по: Sipkema et al., 2003).

встречаются лофоциты (Vilanova et al., 2010) или разнообразные клетки с включениями, ультраструктура которых напоминает таковую клеток в интактных тканях губок (Короткова, 1972; Custudio et al., 1998; Müller et al., 1999; Le Pennec et al., 2003; Chernogor et al., 2011) (рис. 7в). Несмотря на плотную упаковку клеток в составе примморфов, на уровне электронной микроскопии видно, что цитоплазматические мембраны соседних клеток расположены параллельно друг другу и разделенны небольшим расстоянием.

ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИИ ПРИММОРФОВ

Как показали исследования, физиологическое состояние клеток в составе клеточных агрегатов и примморфов отличается от такого в интактных тканях губок.

Исследование уровня теломеразной активности у *Suberites domuncula* (Olivi, 1792) с помощью “Telomerase Detection Kit” (TRAP) показало, что в примморфах он довольно высокий по сравнению с клетками, находящимися в суспензии, но гораздо ниже, чем клетках интактных тканей губки. Теломеразная активность в интактных тканях составляет 8.9 единиц TPG (total product generated) на 5×10^3 клеток. В клетках, которые находились в суспензии 14 часов, теломеразная активность падает до 0.9 единиц TPG на 5×10^3 клеток. В примморфах (10 суток после формирования из отдельных клеток) теломеразная активность возрастает до 4.7 единиц TPG на 5×10^3 клеток (Custudio et al., 1998; Müller et al., 1999).

Теломеразная активность клеток в составе примморфов свидетельствует о том, что они сохраняют способность к митотическим делениям. Исследования митотической активности клеток на разных стадиях процесса реагрегации *S. domuncula* с использованием BrdU-метки (5-бромо-2'-деокси-уридин) показали, что клетки, которые находились в суспензии 24 ч, не включали метку в своих ядрах. Клеточные агрегаты, полученные через 24 ч культивирования, содержали 6.5% BrdU-

положительных клеток. В примморфах количество BrdU-положительных клеток зависело от возраста примморфа. Так, в трехдневных примморфах количество BrdU-положительных клеток составляло 33.8%, а в примморфах возрастом 1 мес. – 22.3%. Эти данные указывают на то, что клетки в примморфах *S. domuncula* синтезируют ДНК и, вероятно, претерпевают клеточные деления (Custudio et al., 1998; Müller et al., 1999).

Способность клеток примморфов к синтезу ДНК и, возможно, к митотическим делениям, указывает на то, что эти клеточные агрегаты имеют предпосылки для роста и прогрессивного развития. Тем не менее, наблюдения показали, что при длительном культивировании примморфов *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789) не происходит увеличения биомассы. Сухой вес примморфов после 20 дней культивирования примерно в 10 раз меньше сухого веса участка тела губки того же объема, что был использован для получения этих примморфов. В ходе этого эксперимента примморфы культивировали в фильтрованной морской воде без добавления каких-либо питательных компонентов (Valisano et al., 2006b).

Примморфы, как и нормальные особи губок, способны к синтезу биологически активных веществ. Уже после 3–6 сут культивирования в экстрактах примморфов *D. avara* наблюдается значительное количество аварола – 0.4–0.9 мкг на 100 мкг тканей. Это составляет примерно 30% от содержания аварола в тканях интактной губки. Содержание аварола в клетках значительно увеличивается после формирования сетчатых примморфов, достигая 1.4 мкг на 100 мкг тканей (80% от содержания аварола в тканях губки) (Müller et al., 2000).

При определенных условиях культивирования, а также при прогрессивном развитии, связанном с регенерацией исходной организации губки, в примморфах начинается активный синтез новых спикул, которые имеют характерную для данного вида губки форму и размеры (Le Pennec et al., 2003; Valisano et al., 2007a; Chernogor et al., 2011b).

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИИ ПРИММОРФОВ

Несмотря на более чем столетнюю историю изучения реагрегации клеток у губок, взгляды исследователей на морфогенетический потенциал примморфов сильно различаются.

В ранних работах, посвященных реагрегации клеток губок (Wilson, 1907; Huxley, 1912; Galtsoff, 1925b) описывается полное восстановление функциональных особей *C. prolifera* и *Sycon raphanus* Schmidt, 1862 из суспензий клеток, полученных механическим методом. Сформировавшиеся в результате реагрегации, округлые клеточные агрегаты были способны к слиянию и прикреплению к субстрату. После прикрепления в агрегатах наблюдалось образование каналов водоносной системы (они появлялись как изолированные лакуны, которые постепенно сливались друг с другом), хоаноцитных камер и элементов скелета. Завершающим этапом реорганизации агрегатов было появление оскулярного возвышения. В полученных таким образом губках наблюдали токи воды и биение жгутиков хоаноцитов. Весь процесс восстановления губки в лаборатории занимал 6–20 сут.

Напротив, ряд современных авторов (Krasko et al., 2002; Wiens et al., 2003) указывает на ограниченные морфогенетические потенции примморфов и невозможность восстановления функциональной особи губки после диссоциации и реагрегации ее клеток. Вместе с тем, было показано, что при культивировании примморфов *S. domuncula* на полилизиновых или галектиновых подложках (Wiens et al., 2003; Müller et al., 2004b), экспонировании их сильному течению (20 см/с) (Perovic et al., 2003), а также при добавлении в культуральную среду ионов железа и кремния (Le Pennec et al., 2003) у примморфов наблюдается формирование каналов водоносной системы и дермальной мембраны. Однако дальнейшего прогрессивного развития агрегатов в ходе этих экспериментов не происходило.

Исследователи расходятся также во мнении относительно процессов, происходящих при морфогенетических преобразованиях примморфов. Разногласия касаются возможности и степени дедифференцировки клеток после их диссоциации, а также возможности трансдифференцировки и участия в формообразовательных процессах клеток различных типов. Так Гексли (Huxley, 1912), Бриан (Brien, 1937) и Бренстед (Brønsted, 1937) рассматривают процессы развития, происходящие после диссоциации тканей, как “самосборку” и перегруппировку клеток в соответствии с их исходной дифференцировкой. При этом Гексли (Huxley, 1912) считает, что после диссоциации тканей клетки временно дедифференцируются, но их редифференцировка возможна только в исходном направлении. Согласно точке зрения упомянутых авторов для развития новой особи необходимо наличие в примморфе всех типов клеток, присутствующих в интактной губке. Другой точки зрения придерживаются Вилсон (Wilson, 1907) и Гальцов (Galtsoff, 1925b), допускающие возможность трансдифференцировки определенных типов клеток и придающие этим клеткам особое значение в морфогенезе. При этом Вилсон (Wilson, 1907) считает, что после диссоциации тканей

все клетки претерпевают дедифференцировку и возвращаются к эмбриональному тотипотентному состоянию. Гальцов (Galtsoff, 1925b), напротив, отрицает возможность дедифференцировки клеток. Изменения клеток, происходящие после диссоциации тканей, он считает лишь неглубокими изменениями морфологии, но никак не дедифференцировкой клеток.

Подробные исследования реагрегации клеток губок, проведенные сотрудниками лаборатории Б.П. Токина Ленинградского государственного университета в 70–80 гг. XX века, позволили ответить на некоторые из этих вопросов. Было показано, что формирование и прогрессивное развитие примморфов сопровождается гибелью части клеток, а также процессами дедифференцировки и трансдифференцировки некоторых типов клеток. В процессе развития примморфа жизнеспособные клетки либо сохраняют свою дифференцировку, либо в определенных случаях могут испытывать трансдифференцировку в другие типы клеток. У представителей класса Demospongiae трансдифференцировке подвергаются в основном ядрышковые амебоциты, а у представителей класса Calcarea – хоаноциты. Эти типы клеток сначала претерпевают процесс дедифференцировки, после чего способны трансдифференцироваться в экзо- и эндопинакоциты, хоаноциты, склероциты и колленциты. Таким образом, восполняется недостаток клеток данных типов. В то же время эндопинакоциты и амебоциты со специфическими включениями сохраняют свою исходную дифференцировку (Ефремова, 1968; Ефремова, 1969; Ефремова, 1972; Ефремова, Никитин, 1974; Никитин, 1974; Волкова, Золоторева, 1981; Короткова, 1997).

В определении судьбы клеток, подвергшихся трансдифференцировке, большую роль играет место, которое они занимают в примморфе. Группы хоанобластов возникают всегда в центральной части примморфа, а пинакоциты – преимущественно на поверхности или вблизи нее. Вероятно, в примморфе возникает определенный физиологический градиент, связанный с формированием различий микросреды в центре и на переферии агрегата, которые и определяют направление трансдифференцировки клеток (Никитин, 1974; Волкова, Золоторева, 1981). Подтверждением этого предположения служит неспособность к прогрессивному развитию агрегатов, размеры которых меньше 150 мкм. У таких агрегатов происходит эпителизация поверхности за счет пинакоцитов, но никогда не появляются хоанобласты, что можно объяснить недостаточным различий микросреды в центре и на периферии агрегата из-за его небольших размеров (Ефремова, Никитин, 1974; Никитин, 1974; Короткова, 1997; Korotkova, 1979).

Работами этой же лаборатории было также подтверждено, что реагрегация клеток разных видов губок идет с неодинаковой интенсивностью и не всегда заканчивается формированием жизнеспособных клеточных агрегатов. Наблюдается корреляция между характером реагрегации клеток у данного вида губки и структурой его жизненного цикла (Korotkova, 1979). Известно, что в ходе жизненного цикла анатомическая структура и тканевая организация губок может претерпевать серьезные сезонные изменения (Korotkova, 1979; Ereskovsky, 2000). Если в жизненном цикле губки после полового размножения присутствует этап формирования внутренних почек или редукционных телец, то обычно у такого вида в результате реагрегации клеток происходит восстановления исходной организации особи. К таким видам относятся пресноводные губки родов *Ephydatia* и *Spongillla*, а также морские представители из родов *Halisarca* и *Halichondria* (Korotkova, 1979). Для клеточных агрегатов *E. fluviatilis* (Ефремова, 1969, 1972), *S. lacustris* (Ефремова, 1972), *H. dujardini* (Волкова, Золотарева, 1981), *H. panicea*, *L. complicata* и *S. lingua* (Короткова, 1972) была показана возможность прогрессивного развития, заканчивающегося формированием новой особи губки. Во время развития агрегаты указанных видов проходят стадии, сходные с описанными для агрегатов *C. prolifera* и *S. raphanus* (Wilson, 1907; Huxley, 1912; Galtsoff, 1925b). Развития агрегатов *E. fluviatilis* в полноценных губок происходит за 6–7 суток. У *H. dujardini, H. panicea*, *L. complicata* и *S. lingua* развитие происходит медленнее – полностью сформировавшиеся губки появляются только через 20–30 сут после начала экспериментов. Это может быть связано с тем, что данные эксперименты проходили при более низких температурах, так как в них использовались холодноводные представители упомянутых видов из Белого моря.

В целом, формирование новой губки при прогрессивном развитии агрегатов включает в себя следующие этапы: 1) реагрегация клеток и формирование устойчивых агрегатов (ранних примморфов) определенного размера; 2) эпитализация поверхности ранних примморфов (преобразование в настоящие примморфы); 3) прикрепление к субстрату; 4) приобретение дефинитивной организации (формирование водоносной системы, скелета и т.д.) (Ефремова, 1969; Короткова, 1972, 1997; Волкова, Золоторева, 1981; Korotkova, 1979).

Для большинства видов губок прикрепление примморфов к субстрату является ключевым моментом развития (Galtsoff, 1925b; Волкова, Золотарева, 1981). Именно в этот момент происходит

изменение полиаксиальной симметрии на апико-базальную. Прикрепление к субстрату сопровождается значительными изменениями в распределении различных типов клеток внутри примморфа. Если отделить развивающийся примморф от субстрата, в его организации начинаются регрессивные изменения (Ефремова, 1969; Короткова, 1972; Ефремова, Никитин, 1974; Galtsoff, 1925b). Вместе с тем, для *H. dujardini*, в отличие от других видов губок, прикрепление к субстрату не является решающим моментом развития. Примморфы этого вида способны развиваться во взвешенном состоянии. Однако отсутствие контакта с субстратом влияет на завершающий этап развития – формирование оскулюма. У неприкрепленных примморфов формируется не одно, а несколько оскулярных отверстий (Волкова, Золоторева, 1981).

Приведенные выше факты однозначно говорят в пользу возможности восстановления исходной организации губки в процессе реагрегации ее клеток. С большой долей вероятности можно утверждать, что во время реагрегации клеток и при последующем формировании губки основное значение играют процессы, связанные с дедифференцировкой и трансдифференцировкой клеток, а также с различным поведением клеток в зависимости от их положения в примморфе. Это позволяет полностью отказаться от представлений о процессах, происходящих после диссоциации тканей губок, как о "самосборке" исходно дифференцированных клеток.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ПРОЦЕСС РЕАГРЕГАЦИИ

На процесс реагрегации клеток, а также на размеры получаемых клеточных агрегатов, их количество, структуру и физиологию влияет множество различных факторов.

Физиологическое состояние губки. Физиологическое состояние особи, клеточный материал которой используется для экспериментов, оказывает существенное влияние на протекание процесса реагрегации. Долгое (более 14 сут) содержание губки в аквариуме перед проведением экспериментов негативно отражается на реагрегации клеток. Как результат – в суспензиях клеток, полученных от таких особей, происходит формирование только мелких клеточных агрегатов, не способных к дальнейшему прогрессивному развитию и погибающих в течение нескольких суток (Galtsoff, 1925a; Valisano et al., 2006b). Это можно объяснить общим ухудшением состояния губок при длительном содержании в простых аквариальных системах.

Существенным фактором является и стадия жизненного цикла губки. На *E. fluviatilis* показано, что с наибольшей эффективностью процесс реагрегации протекает в суспензиях клеток, полученных от особей, которые только приступили к половому размножению или геммулогенезу. Если же в экспериментах используются особи, уже активно формирующие геммулы, начальные этапы реагрегации клеток идут очень быстро, но затем наблюдается замедление морфогенезов, связанных с прикреплением к субстрату и формированием водоносной системы. При использовании клеточного материала молодых особей губки в культурах клеток формируются только очень мелкие агрегаты, состоящие преимущественно из хоаноцитов и не способные к дальнейшему развитию (Ефремова, 1969; Ефремова, 1972; Короткова, 1997).

Криоконсервация суспензии клеток. В большинстве случаев эксперименты по реагрегации клеток губок лучше проводить со свежеполученной суспензией клеток. Тем не менее, возможно использование криоконсервация клеток. На суспензиях клеток нескольких видов из класса Demospongiae было показано, что криоконсервация незначительно снижает жизнеспособность клеток. Так, свежеполученные суспензии клеток изученных видов содержат 80–100% живых археоцитов. После криоконсервации в 15% растворе DMSO количество живых арехеоцитов снижается до 70–95% (Pomponi, 2006).

Клеточный состав суспензии. Суспензию клеток, полученную путем диссоциации тканей губки, можно разделить на размерные фракции путем ее центрифугирования в ступенчатых или непрерывных плотностных градиентах. Размерные фракции представляют собой или чистые фракции клеток определенного типа, или фракции, обогащеные каким-либо типом клеток.

Например, фракционирование суспензии клеток морской губки *Hymeniacidon perlevis* (Montagu, 1818) позволяет получить 3 фракции клеток: C_1 – фракция, обогащенная мелкими клетками (80% составляют клетки менее 2 мкм в диаметре); C_2 – фракция, содержащая смесь из клеток всех размерных классов; C_3 – фракция, обогащенная крупными клетками (76% составляют клетки 10–15 мм в диаметре, которые можно охарактеризовать как археоциты и археоцитоподобные клетки) (Zhang et al., 2003b). Попытки получить примморфы из клеток отдельных фракций показали, что способностью к образованию примморфов обладала только фракция крупных клеток C_3. При использовании этой фракции примморфы формировались уже на 2-е сутки, в то время как при использовании обычной суспензии клеток, полученной от того же экземпляра губки, примморфы формировались только на 4–5-е сут. Кроме того, примморф-

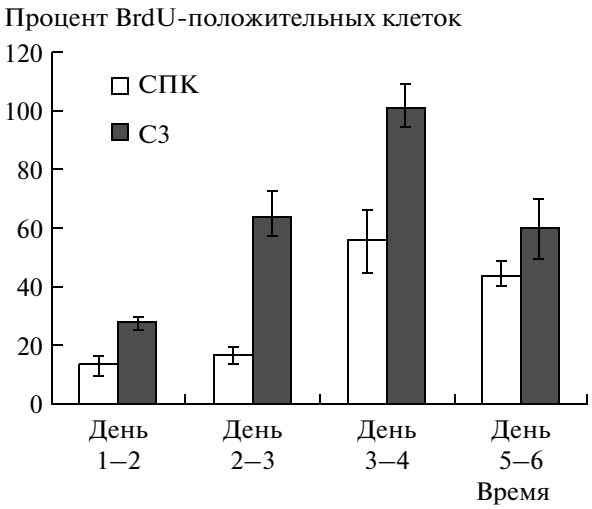

Рис. 8. Относительное количество BrdU-положительных клеток на разных этапах процесса реагрегации у *H. agminata*. СПК – обычная суспензия клеток, С3 – фракция клеток C_3, обогащенная археоцитами и археоцитоподобными клетками. Планки погрешностей отражают среднеквадратичное отклонение шести повторностей (по: Zhang et al., 2003b).

фы, полученные из фракции крупных клеток C_3, обладали более правильной и гладкой формой и на протяжении всего эксперимента демонстрировали более высокий уровень синтеза ДНК по сравнению с обычными примморфами (Zhang et al., 2003b) (рис. 8).

В суспензии клеток пресноводной губки *E. fluviatilis* удается выделить следующие фракции клеток (De Sutter, Van de Vyver, 1977, 1979; Buscema et al., 1980): A_1 – чистая фракция археоцитов; B_{2+3} – фракция, включающая все типы клеток губки, кроме археоцитов; C_2 – фракция, обогащенная хоаноцитами; C_3 – фракция, включающая все типы клеток губки, кроме археоцитов и хоаноцитов.

Процесс реагрегации клеток во фракции A_1 ведет к формированию примморфов через 24 ч и к дальнейшему восстановлению исходной организации губки через 2–3-е сут (De Sutter, Van de Vyver, 1977; Buscema et al., 1980). Авторы не проводили сравнения темпов реагрегации в данной фракции и в обычной суспензии клеток, полученной от той же особи. Вместе с тем, данные Ефремовой о темпах реагрегации обычной суспензии клеток этого вида свидетельствуют, что как и у *H. perleve*, археоцитная фракция клеток *E. fluviatilis* проявляет ускоренный темп реагрегации (Ефремова, 1969).

Во фракции B_{2+3} процесс реагрегации доходит только до стадии примморфов. Дальнейшего восстановления губки не происходит. Клетки во фракции C_2 агрегируют быстрее, по сравнению с клетками других фракций, но процесс реагрегации доходит только до стадии клеточных агрегатов, которые погибают через несколько суток после своего формирования. Фракция C_3 не обладает способностью к реагрегации (De Sutter, Van de Vyver, 1977, 1979).

Короткова (Короткова, 1997; Korotkova, 1979) для изучения влияния клеточного состава суспензии на процесс реагрегации клеток производила сборку клеточных агрегатов с помощь микроманипуляторов. В результате были получены искусственные клеточные агрегаты, в состав которых входил только один тип клеток губки. Было показано, что агрегаты, состоящие только из пинакоцитов или хоаноцитов, не способны к преобразованию в функциональную губку. Агрегаты из арехеоцитов проявляют бóльшие морфогенетические потенции и способны восстановить исходную организацию животного в течение 6–7 сут.

Приведенные данные указывают, что различные типы клеток губок обладают неодинаковыми морфогенетическими потенциями и способностью к дедифференцировке и трансдифференцировке, а также к индукции восстановительных процессов.

Концентрация клеток в суспензии. Исходя из общих соображений, можно предположить, что концентрация клеток в суспензии должна влиять на процесс реагрегации. И в самом деле, исследование, проведенное на *S. domuncula*, показало, что при использовании бóльшей начальной концентрации клеток формируются более крупные примморфы. Так, увеличение концентрации клеток в суспензии в 3 раза (с 2×10^7 кл/мл до 6×10^7 кл/мл) привело почти к трехкратному увеличению размеров примморфов (Sipkema et al., 2003). У *Hymeniacidon agminata* Ridley, 1884 при повышении концентрации клеток увеличивается не только размеры

примморфов, он и скорость их формирования (Zhang et al., 2003a). Влияние концентрации клеток в начальной суспензии на скорость формирования и размеры примморф в первую очередь должно проявляться у видов губок, разрозненные клетки которых не обладают амебоидной подвижностью.

Температура. Влияние температуры на реагрегацию клеток губок неоднозначно. Для суспензий клеток *H. agminata* (вид из Южно-Китайского моря; до начала экспериментов губок содержали в аквариуме при температуре 24–26°C) оптимальной является высокая температура. При 30°C примморфы данного вида губки появляются уже через 24 ч, при 25°C на этот процесс требуется 2–3-е сут, а при 15°C примморфы вообще не формируются (Zhang et al., 2003a).

Противоположные результаты получены в исследованиях, проведенных на примморфах *P. ficiformis* (вид из Средиземного моря; до начала экспериментов губок содержали в аквариуме при температуре 12°C) и *L. baicalensis* (вид из оз. Байкал; до начала экспериментов губок содержали в аквариуме при температуре 3–4°C) – оптимальной для реагрегации оказалась низкая температура. Так, в культурах *P. ficiformis* при 12°C размеры примморфов составили 0.1 мм^2, а при 24°C – 0.04 мм^2. Кроме того, в первую неделю культивирования при 24°C наблюдалась высокая смертность примморфов (Valisano et al., 2007b). Для *L. baicalensis* оптимальной была температура 3–6°C – при данной температуре происходило активное образование примморфов, и они долгое время сохраняли жизнеспособность. При 12°C формирование примморфов происходило медленнее, кроме того, многие примморфы погибали через несколько дней после начала экспериментов. При температуре 18°C реагрегацию клеток *L. baicalensis* наблюдали только в первые часы, после чего клетки погибали (Chernogor et al., 2011).

Очевидно, температура, оптимальная для процесса реагрегации клеток, напрямую связана с экологическими условиями, в которых обитают соответствующие виды губок.

Культуральная среда. Обычно в качестве культуральной среды для культивирования клеток губок используют стерилизованную фильтрацией пресную или морскую воду. Но часто для успешного долговременного содержания культур примморфов в культуральную среду добавляют антибиотики и фунгициды для предотвращения чрезмерного размножения бактерий и появления грибковых заражений, которые оказывают негативное влияние на процесс реагрегации клеток губок. Однако разные антибиотики и фунгициды оказывают на культуру примморфов неодинаковое воздействие. Так, добавление в культуральную среду пенициллина, гентамицина, рифампицина, стрептомицина или смеси пенициллина-стрептомицина заметно не влияет на реагрегацию клеток (Sipkema et al., 2003; Pomponi, 2006). Однако добавление смеси четырех антибиотиков (канамицина, тулозина, тетрациклина, гентамицина) ингибирует формирование примморфов у 7 средиземноморских видов губок (*S. domuncula, G. cydonium, S. massa, Pseudosuberites* aff. *andrewsi, H. panicea, H. oculata, A. polypoides*). В присутствии этих антибиотиков формируются только аморфные клеточные агрегаты. Возможно, негативное влияние связано со слишком высокой концентрацией антибиотиков в этой смеси – концентрации тилозина и тетрациклина были превышены в 10 раз по сравнению с рекомендациями производителя (Sipkema et al., 2003).

Приведенные данные представляют дополнительный интерес, если принять во внимание, что все виды губок образуют тесные и специфические симбиотические ассоциации с бактериями. Многие губки населены сложным микробным сообществом, которое может составлять до 40% от массы тела животного. Симбиотические бактерии принимают участие в утилизации продукты обмена губок, передают им питательные вещества или производят вторичные метаболиты для химической защиты хозяина от хищников и обрастателей (Кутерницкая и др., 2008; Haygood et al., 1999; Lee et al., 2001; Thakur et al., 2003). Также было показано, многие метаболиты, в том числе и потенциальные биологически активные вещества, представляют собой продукт совместной жизнедеятельности клеток губок и симбиотических бактерий (Müller et al., 2004a).

Вполне возможно, элиминация симбиотических бактерий из клеток суспензии при добавлении антибиотиков в культуральную среду может препятствовать полноценной реагрегации клеток и дальнейшему восстановлению структуры губки. Подобные данные были получены при исследованиях реагрегации клеток *H. dujardini*. В культурах клеток этого вида губок процесс реагрегации полностью останавливается, если непосредственно после получения суспензии в культуральную среду добавляют антибиотик ампициллин. В таких культурах не происходит формирования ни клеточных агрегатов, ни примморфов. Если же добавление антибиотика происходит через 20–30 мин после начала культивирования суспензии клеток, то формирование клеточных агрегатов и примморфов идет нормально и внешне не отличается от контроля (реагрегация клеток в среде без антибиотика). По мнению авторов исследования, такой результат экспериментов говорит о том, что начальный пе-

риод реагрегации клеток является важнейшим для определения дальнейшего взаимодействия клеток губок и их симбиотических бактерий (Кутерницкая и др., 2008).

Из сказанного выше ясно, что для успешного долговременного содержания примморфов, необходимо проводить подбор оптимального набора и дозы антибиотиков для каждого конкретного вида губки. При этом следует обращать внимание не только на эффективность антибиотика в подавлении микробного заражения, но и на характер его влияния на клетки губок. Кроме того, полноценное функционирование клеток губок, судя по всему, практически невозможно без симбиотических бактерий. Этот факт также следует учитывать при подборе условий для долговременного культивирования примморфов, а также при постановке экспериментов, связанных с восстановлением полноценной особи губки из суспензии клеток.

Применение фунгицида амфотерицина оказывает негативное влияние на реагрегацию клеток. Причиной подобного влияния является механизм действия данного фунгицида: афотерицин разрушает клетки грибов путем присоединения к основному стеролу их клеточных мембран – эргостеролу. Биохимические исследования нескольких видов губок (*D. avara, Ircinia pipette* (Schmidt, 1868)*, Spongionella gracilis* (Vosmaer, 1883)*, Tethya aurantium* (Pallas, 1766)) показали, что эргостерол присутствует в мембранах их клеток. Более того, эргостерол является основным стеролом клеточных мембран у *D. avara*, *I. pipetta* и *S. gracilis* (Sipkema et al., 2003, 2004).

Подбор подходящего состава культуральной среды может увеличить продолжительность жизни клеточных агрегатов и примморфов в культуре и интенсифицировать метаболизм клеток в их составе. В результате это может обеспечить увеличение биомассы в культуре, более быстрое развитие примморфов в функциональных губок и усиление продукции биологически активных веществ. К настоящему времени большая часть исследований, направленных на создание культуральной среды для клеток губок, были выполнены на культурах диссоциированных клеток. Тем не менее, ряд подобных исследований был проведен и на примморфах.

На культурах примморфов некоторых видов губок изучали влияние добавления в культуральную среду ионов кремния и железа. Основаниями для таких экспериментов послужили данные о том, что ионы железа и кремний интенсифицируют синтез ДНК и белков в клетках губок, а также усиливают спикулогенез (Krasko et al., 2002). Однако результаты, полученные на разных видах губок, довольно противоречивы. Так, добавление 60 мкМ ионов кремния в культуру примморфов *S. domuncula* вызвало увеличение их размеров в три раза (с 2 мм до 6 мм). Последующее добавление 30 мкМ ионов железа вызвало дополнительное увеличение размеров примморфов до 10 мм и развитие каналов водоносной системы (Le Pennec et al., 2003).

В то же время, добавление 60 мкМ ионов кремния и 30 мкМ ионов железа в культуру примморфов *P. ficiformis* вызывало лишь слабый эффект, а увеличение концентрации ионов железа до 60 мкМ приводило к разрушению агрегатов в течение нескольких недель. Наиболее выраженный положительный эффект вызывало добавление в среду только ионов кремния в концентрациях 120 или 180 мкМ (Valisano et al., 2007a).

Добавление в среду только ионов кремния или ионов железа и кремния вызывало спикулогенез у примморфов двух упомянутых выше видов, а также у примморфов пресноводной губки *L. baicalensis*. В случае *P. ficiformis* увеличивалось не только количество спикул, но их размеры (Krasko et al., 2002; Le Pennec et al., 2003; Valisano et al., 2007a; Chernogor et al., 2011b).

Механизм влияния ионов железа и кремния на увеличения размеров агрегатов остается неясным. Развитие каналов может быть связано с недостатком кислорода при увеличении размеров примморфов. Водоносная система в этом случае служит для доставки кислорода к тканям агрегата (Le Pennec et al., 2003). Вместе с тем нет данных о фоновых значениях концентраций ионов железа и кремния в изначальной культуральной среде, и рассматривалось влияние лишь добавленных концентраций этих элементов.

На культурах диссоциированных клеток морских губок было показано, что добавление в среду пирувата, витамина С, хлорида натрия и ионов железа вызывает значительное увеличение жизнеспособности клеток (Zhang et al., 2004; Zhao et al., 2005; Pomponi, 2006; de Caralt et al., 2007). Положительное влияние на жизнеспособность клеток и на интенсивность их метаболизма (уровень синтеза ДНК и белков, активность эстеразы) оказывает добавление в среду некоторых факторов роста и гормонов (фитогемагглютинина, инсулина, эпидермального фактора роста, простогландина Е2), а также культивация клеток губок в разбавленных коммерческих средах, которые обычно используются для культивации клеток млекопитающих (Osinga et al., 1999; Pomponi, 2006; de Caralt et al., 2007).

Совершенно очевидно, что состав культуральной среды оказывает значительное влияние на процесс реагрегации клеток губок. Однако, не-

смотря на то, что изучению данной проблемы посвящено довольно много работ, многие полученные результаты неоднозначны и варьируют от эксперимента к эксперименту или от объекта к объекту.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В меняющихся гидродинамических условиях окружающей среды губкам, для осуществления эффективной фильтрации воды через всю поверхность и объем тела, необходимо постоянно перестраивать свою водоносную систему. В связи с этим ткани, клеточные линии и организация водоносной системы этих животных крайне пластичны (Ересковский, 2005). В тоже время, несмотря на постоянное перемещение клеток и ремоделирование анатомических структур, губка является единым интегрированным организмом. В своей организации эти животные смогли найти баланс между очень высокой пластичностью всех структур в теле и интеграцией этих структур в единую систему. Это требует наличия механизмов межклеточной интеграции и коммуникации, значительно отличающихся от таковых у других Metazoa. Реагрегация клеток губок представляет собой удобную модельную систему, которая позволяет в контролируемых условиях исследовать различные аспекты функционирования тканей у губок.

Реагрегация клеток губок включает в себя несколько стадий: 1) адгезия клеток и формирование стабильных многоклеточных агрегатов, 2) эпителизация многоклеточных агрегатов (формирование примморфов) и, в некоторых случаях, 3) развитие примморфов в полностью функциональную губку. Различные этапы этого процесса позволяют изучать механизмы клеточной адгезии и иммунного распознавания, поведение и взаимодействие клеток разных типов, а также проследить восстановление исходных связей между клетками и формирования основных структурных элементов организма.

Реагрегация клеток губок происходит благодаря высокомолекулярному комплексу – фактору агрегации. Судя по накопленным данным, этот же комплекс принимает участие в обеспечении видовой и, вероятно, индивидуальной специфичности клеток и тканей губок. При этом многие детали протекания иммунного распознавания у губок, а также молекулярные механизмы, его обеспечивающие, до конца не изучены (Fernandez-Busquets, 2002). Совмещение у губок механизмов клеточной адгезии и иммунного распознавания позволяют использовать ранние этапы процесса реагрегации для изучения механизмов иммунного распознавания на уровне отдельных клеток или клеточных линий. Из-за относительно простой организации губок и отсутствия у них органов можно предположить, что и иммунная система этих животных устроена относительно просто. Исследование иммунной системы у самых примитивных Metazoa может помочь лучше понять устройство и детали функционирования иммунной системы у высокоорганизованных животных, в том числе и человека.

Интенсивность процесса реагрегации клеток различается не только у разных видов губок, но и внутри одного вида в зависимости от физиологического состояния особи, связанного со стадиями жизненного цикла. Для многих губок характерны сильные перестройки тканей в ходе жизненного цикла, дегенеративные и регенеративные явления, связанные с половым и бесполым размножением (Ereskovsky, 2000). Судя по всему, морфогенетические потенции диссоциированных клеток и, как следствие, протекание реагрегации клеток сильно зависят от исходного физиологического состояния особи. Следовательно, изучение процесса реагрегации у широкого спектра видов губок на разных этапах их жизненных циклов позволит понять морфогенетические потенции и взаимоотношения клеточных линий, а также изменения физиологического состояния клеток в зависимости от стадии жизненного цикла и связанные с этим изменения морфогенетических потенций клеток.

Особый интерес представляет стадия примморфов. После окончательного формирования данных агрегатов у ряда видов губок наблюдается восстановление исходной организации животного. Этот процесс является результатом не простой “самосборки” и сортировки дифференцированных клеток. В ходе описанных восстановительных морфогенезов имеют место активные дедифференцировки и трансдифференцировки определенных клеточных типов. Дальнейшая судьба клеток, судя по всему, определяется их положением в агрегате. В процессе развития примморфов происходит формирование новой системы координат, регулирующей дальнейшие процессы восстановления организации губки. Таким образом, формирование примморфов и восстановление из них полноценных губок позволяют изучать процессы становления и регуляции пространственной организации многоклеточных организмов в их онтогенезе. Примером таких работ может служить изучение роли Wnt сигнального пути в формировании эктопических оскулюмов у губки *Oscarella lobularis* (Lapébie et al., 2009; Winsdor, Leys, 2010; Ereskovsky et al., 2013).

Самостоятельный интерес представляют вопросы, касающиеся процессов, определяющих и регулирующих возможность восстановления ин-

тактной организации губки из примморфов. Детальное изучение поведения клеток во время преобразования примморфов в полноценную губку позволит понять механизмы, которые обеспечивают интеграцию тканей губок и высокую пластичность клеточных и анатомических структур в их теле. До сих пор малоизученным остается вопрос о роли внеклеточного матрикса в регуляции развития и функционирования губок и других многоклеточных животных (Aouacheria et al., 2006). Необходимо не только определение основных компонентов внеклеточного матрикса, но и изучение механизмов, регулирующих его выделение на разных стадиях онтогенеза организма. Это позволит проанализировать влияние внеклеточного матрикса на поведение клеток. Примморфы, как модельная система, в определенной степени облегчают решение этой задачи, так как позволяют проводить исследования в контролируемых условиях, что затруднительно при работе с интактными губками.

Потенциально возможные долговременные стабильные культуры примморфов позволят также изучать биохимию и физиологию различных клеток, процессы спикулогенеза. Кроме того, долговременные культуры примморфов могут стать основой для получения биологически активных веществ губок для фармацевтической и косметической промышленности (Fernandez-Busquets, 2002; Pomponi, 2006). Тем не менее, для этого требуется серьезная доработка методов, связанная, в первую очередь, с подбором состава культуральной среды и условий культивации примморфов. Это необходимо для увеличения продолжительности жизни примморфов, а также для стимуляции в них митотических делений, которые обеспечат увеличение биомассы в культурах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Волкова М.А., Золоторева Г.А. Развитие *Halisarca dujardini* Jonhston из конгломератов соматических клеток // Морфогенезы у губок. Л.: Изд-во ЛГУ, 1981. С. 74–93.

Ересковский А.В. Сравнительная эмбриология губок (Porifera). СПб.: Изд-во С.-Петер. ун-та, 2005. 304 с.

Ефремова С.М. Характер пролиферативной активности разных типов клеток губки *Ephydatia fluviatilis* в ходе развития после диссоциации // Архив АГЭ. 1968. Т. 54. № 3. С. 96–100.

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. Л.: Изд-во ЛГУ, 1972. С. 110–154.

Ефремова С.М., Дроздов А.С. Прижизненные наблюдения над ранними этапами агрегации изолированных клеток губки *Ephydatia fluviatilis* // Вестник ЛГУ. 1970. № 15. С. 18–23.

Ефремова С.М., Никитин Н.С. Формообразовательные потенции различного размера конгломератов соматических клеток пресноводной губки *Ephydatia fluviatilis* // Морфогенетические процессы при бесполом размножении, соматическом эмбриогенезе и регенерации. Л.: Изд-во ЛГУ, 1974. С. 97–105.

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

Короткова Г.П. Регенерация животных. СПб: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 1997. 479 с.

Кутерницкая Е.А., Вишняков А.Э., Ересковский А.В. Изучение строения симбиотических бактерий беломорской губки *Halisarca dujardini* Johnston (Porifera, Demospongiae, Halisarcida) и их возможного влияния на формирование примморф // Вестник СПбГУ. 2008. Т. 3. № 4. С. 10–15.

Лавров А.И., Косевич И.А. Реагрегация клеток у губок // Природа. 2013. № 2. С. 87–90.

Никитин Н.С. Формообразовательные потенции конгломератов ядрышковых амебоцитов пресноводной губки *Ephydatia fluviatilis* // Морфогенетические процессы при бесполом размножении, соматическом эмбриогенезе и регенерации. Л.: Изд-во ЛГУ, 1974. С. 134–142.

Языков А.А. Аггрегация диссоциированных клеток у губок *Reniera cinerea* (Grant), *Halichondria panicea* (Pallas) и *Ephydatia fluviatilis* (Lamarck) и способность образовавшихся многоклеточных комплексов к реституции в целый организм // ЖОБ. 1965. Т. 26. № 6. С. 690–693.

Adamska M., Degnan B.M., Green K. et al. What sponges can tell us about the evolution of developmental processes // Zoology. 2011. V. 144. № 1. P. 1–10.

Aouacheria A., Geourjon C., Aghajari N. et al. Insights into early extracellular matrix evolution: spongin short chain collagen-related proteins are homologous to basement membrane type IV collagens and form a novel family widely distributed in invertebrates // Mol. Biol. Evol. 2006. V. 23. № 12. P. 2288–2302.

Brien P. La réorganisation de l'Eponge après la dissociation par la filtration et phénomènes d'involution chez *Ephydatia fluviatilis* // Arch. Biol. 1937. V. 48. P. 185–268.

Bond C. Continuous cell movements rearrange anatomical structures in intact sponges // J. Exp. Zool. 1992. V. 263. № 3. P. 284–302.

Brønsted H.V. Über zelluläre entwicklungen in den restitution processen beim süßwasserschwamm *Spongilla lacustris* (L.) // Arch. exp. Zelliorsch. 1937. V. 19. P. 35–53.

Buscema M., De Sutter D., Van de Vyver G. Ultrastructural study of differentiation processes during aggregation of

purified sponge archaeocytes // Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 1980. V. 188. № 1. P. 45–53.

Chernogor L.I., Denikina N.N., Belikov S.I. et al. Long-term cultivation of primmorphs from freshwater Baikal sponge *Lubomirskia baikalensis* // Mar. Biotechnol. 2011a. V. 13. № 4. P. 782–792.

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 Chem. Curr. Res. 2011. S2. 001.

Curtis A.S.G. Pattern and mechanism in the reaggregation of sponges // Nature. 1962. V. 196. № 4851. P. 245–248.

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 // Mech. Ageing Dev. 1998. V. 105. № 1–2. P. 45–59.

de Caralt S., Uriz M.J., Wijffels R.H. Cell culture from sponges: pluripotency and immortality // Trends Biotechnol. 2007. V. 25. № 10. P. 467–471.

De Sutter D., Van de Vyver G. Isolation and recognition properties of some definite sponge cell types // Dev. Comp. Immunol. 1979. V. 3. P. 389–397.

De Sutter D., Van de Vyver G. Aggregative properties of different cell types of the fresh-water sponge *Ephydatia fluviatilis* isolated on ficoll gradients // Wilhelm Roux Arch. Dev. Biol. 1977. V. 181. № 2. P. 151–161.

Ereskovsky A.V. Reproduction cycles and strategies of the cold-water sponges *Halisarca dujardini* (Demospongiae, Halisarcida), *Myxilla incrustans* and *Iophon piceus* (Demospongiae, Poecilosclerida) from the White Sea // Biol. Bull. 2000. V. 198. № 1. P. 77–87.

Ereskovsky A.V. Sponge embryology: the past, the present and the future // Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 2007. P. 41–52.

Ereskovsky A.V., Renard E., Borchiellini C. Cellular and molecular processes leading to embryo formation in sponges: evidences for high conservation of processes throughout animal evolution // Dev. Genes Evol. 2013. V. 223. № 1–2. P. 5–22.

Fernàndez-Busquets X. The sponge as a model of cellular recognition // Sourcebook of models for biomedical research. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2008. P. 75–83.

Fernàndez-Busquets X., Burger M. The main protein of the aggregation factor responsible for species-specific cell adhesion in the marine sponge *Microciona prolifera* is highly polymorphic // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 44. P. 27839–27847.

Fernàndez-Busquets X., Gerosa D., Hess D. et al. Accumulation in marine sponge grafts of the mRNA encoding the main proteins of the cell adhesion system // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 45. P. 29545–29553.

Fernàndez-Busquets X., Burger M.M. Cell adhesion and histocompatibility in sponges // Microsc. Res. Tech. 1999. V. 44. № 4. P. 204–218.

Fernàndez-Busquets X., Kuhns W.J., Simpson T.L. et al. Cell adhesion-related proteins as specific markers of sponge cell types involved in allogeneic recognition // Dev. Comp. Immunol. 2002. V. 26. № 4. P. 313–323.

Galtsoff P.S. The amoeboid movement of dissociated sponge cells // Biol. Bull. 1923. V. 45. № 3. P. 153–161.

Galtsoff P.S. Regeneration after dissociation (an experimental study on sponges). I. Behavior of dissociated cells of *Microciona prolifera* under normal and altered conditions // J. Exp. Zool. 1925a. V. 42. № 1. P. 183–221.

Galtsoff P.S. Regeneration after dissociation (an experimental study on sponges). II. Histogenesis of *Microciona prolifera* // J. Exp. Zool. 1925b. V. 42. № 1. P. 223–255.

Gaino E., Zunino L., Burlando B. et al. The locomotion of dissociated sponge cells: A cell-by-cell, time-lapse film analysis // Cell Motil. 1985. V. 5. № 6. P. 463–473.

Gaino E., Burlando B. Sponge cell motility: A model system for the study of morphogenetic processes // Boll. Zool. 1990. V. 57. № 2. P. 109–118.

Haygood M.G., Schmidt E.W., Davidson S.K., Faulkner D.J. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1999. V. 1. № 1. P. 33–43.

Humphreys T. Chemical dissolution and *in vitro* reconstruction of sponge cell adhesion. I. Isolation and functional demonstration of components involved // Dev. Biol. 1963. V. 8. № 1. P. 27–47.

Humphreys T. Biochemical analysis of sponge cell aggregation // Symp. Zool. Soc. Lond. 1970. V. 25. P. 325–334.

Huxley J. Some Phenomena of Regeneration in *Sycon*; with a Note on the Structure of Its Collar-Cells // Phil. Trans. R. Soc. B. 1912. V. 202. P. 165–189.

Korotkova G. Pecularities of somatic embriogenesis in sponges // Biologie des Spongiaures. Paris: Coll. Internat. C.N.R.S. 1978. V. 291. P. 53–58.

Krasko A., Schröder H.C., Batel R. et al. Iron induces proliferation and morphogenesis in primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula* // DNA Cell Biol. 2002. V. 21. № 1. P. 67–80.

Larroux C., Fahey B., Liubicich D., Hinman V.F., Gauthier M., Gongora M., Green K., Wörheide G., Leys S.P., Degnan B.M. Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity // Evol. Dev. 2006. V. 8. № 2. P. 150–173.

Le Pennec G., Perovic S., Ammar M.S.A. et al. Cultivation of primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula*: morphogenetic potential of silicon and iron // J. Biotech. 2003. V. 100. № 2. P. 93–108.

Lee Y.K., Lee J.H., Lee H.K. Microbial symbiosis in marine sponges // J. Microbiol. 2001. V. 39. № 4. P. 254–264.

Leith A. Role of aggregation factor and cell type in sponge cell adhesion // Biol. Bull. 1979. V. 156. № 2. P. 212–223.

Lapébie P., Gazave E., Ereskovsky A. et al. WNT/beta-catenin signalling and epithelial patterning in the homoscleromorph sponge *Oscarella* // PLoS One. 2009. V. 4. № 6. e5823

Moscona A. A. Cell aggregation: properties of specific cell-ligands and their role in the formation of multicellular systems // Dev. Biol. 1968. V. 18. № 3. P. 250–277.

Müller W.E.G. How was metazoan threshold crossed? The hypothetical Urmetazoa // Comp. Biochem. Phys. A. 2001. V. 129. № 2–3. P. 433–460.

Müller W.E.G., Wiens M., Batel R. et al. Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula* // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1999. V. 178. № 1. P. 205–219.

Müller W.E.G., Bohm M., Batel R. et al. Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: systhesis of avarol by primmorphs from *Dysidea avara* // J. Nat. Prod. 2000. V. 63. № 8. P. 1077–1081.

Müller W.E.G., Müller I.M. Analysis of the sponge [Porifera] gene repertoire: implications for the evolution of the metazoan body plan // Prog. Mol. Subcell. Biol., 2003. V. 37. P. 1–33.

Müller W.E.G., Grebenjuk V.A., Le Pennec G., Schröder H.C., Brümmer F., Hentschel U., Müller I.M., Breter H.J. Sustainable production of bioactive compounds by sponges – cell cultures and gene cluster approach: a review // Mar. Biotechnol. 2004a. V. 6. № 2. P. 105–117.

Müller W.E.G., Thakur N.L., Ushijima H. et al. Matrix-mediated canal formation in primmorphs from the sponge *Suberites domuncula* involves the expression of CD36 receptor-ligand system // J. Cell. Sci. 2004b. V. 117. № 12. P. 2579–2590.

Osinga R., Tramper J., Wijffels R.H. Cultivation of marine sponges // Mar. Biotechnol. 1999. V. 1. № 6. P. 509–532.

Pick K.S., Philippe H., Schreider F. et al. Improved phylogenetic taxon sampling noticeably affects nonbilaterian relationships // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. № 9. P. 1983–1987.

Pomponi S.A. Biology of the Porifera: cell culture // Can. J. Zool. 2006. V. 84. № 2. P. 167–174.

Popescu O., Misevic G.N. Self-recognition by proteoglycans // Nature. 1997. V. 386. № 6622. P. 231–232.

Sipkema D., van Wielink R., van Lammeren A.A.M. et al. Primmorphs from seven marine sponges: formation and structure // J. Biotechnol. 2003. V. 100. № 2. P. 127–139.

Sipkema D., Snijders A.P.L., Schroen C.G.P.H. et al. The life and death of sponge cells // Biotechnol. Bioeng. 2004. V. 85. № 3. P. 239–247.

Spiegel M. The role of specific antigens in cell adhesion. Part I. The reaggregation of sponge cells // Biol. Bull. 1954. V. 107. № 1. P. 130–148.

Srivastava M., Begovic E., Chapman J. et al. The *Trichoplax* genome and the nature of placozoans // Nature. 2008. V. 454. № 7207. P. 955–960.

Srivastava M., Simakov O., Chapman J. et al. The *Amphimedon queenslandica* genome and the evolution of animal complexity // Nature. 2010. V. 466. № 7307. P. 720–726.

Thakur N.L., Hentschel U., Krasko A., Pabel C.T., Anil A.C., Müller W.E.G. Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for epibacterial chemical defense // Aquat. Microb. Ecol. 2003. V. 31. № 1. P. 77–83.

Tyler S. Epithelium – the primary building block for metazoan complexity // Integr. Comp. Biol. 2003. V. 43. № 1. P. 55–63.

Valisano L., Bavestrello G., Giovine M. et al. Primmorphs formation dynamics: a screening among Mediterranean sponges // Mar. Biol. 2006a. V. 149. № 5. P. 1037–1046.

Valisano L., Bavestrello G., Giovine M. et al. Seasonal production of primmorphs from the marine sponge *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789) and new culturing approaches // Exp. Mar. Biol. Ecol. 2006b. V. 337. № 2. P. 171–177.

Valisano L., Bavestrello G., Giovines M. et al. Effect of iron and dissolved silica on primmorphs of *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789) // Chem. Ecol. 2007a. V. 23. № 3. P. 233–241.

Valisano L., Arillo A., Bavestrello G. et al. Influence of temperature on primmorph production in *Petrosia ficiformis* (Porifera: Demospongiae) // Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. Rio de Janeiro, Museu Nacional, 2007b. P. 639–643.

Van de Vyver G. Phenomena of cellular recognition in sponges // Curr. Top. Dev. Biol. 1975. V. 10. P. 123–140.

Vilanova E., Countiho C., Maia G. et al. Sulfated polysaccharides from marine sponges: conspicuous distribution among different cell types and involvement on formation of *in vitro* cell aggregates // Cell Tissue Res. 2010. V. 340. № 3. P. 523–531.

Wiens M., Mangoni A., D'Esposito M. et al. The molecular basis for the evolution of the metazoan bodyplan: extrecellular matrix-mediated morphogenesis in marine Demosponges // J. Mol. Evol. 2003. V. 57. № 1. P. 60–75.

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

Wilson H.V. Development of sponges from dissociated tissue cells // Bull. Bureau Fisheries, 1910. V. 30. P. 1–30.

Winsdor P., Leys S. Wnt signaling and induction in the sponge aquiferous system: evidence for an ancient origin of the organizer // Evol. Dev. 2010. V. 12. № 5. P. 484–493.

Zhang W., Zhang X., Cao X. et al. Optimizing the formation of *in vitro* sponge primmorph from Chinese sponge *Stylotella agminata* // J. Biotech. 2003a. V. 100. № 2. P. 161–168.

Zhang X., Cao X., Zhang W. et al. Primmorphs from archaeocytes-dominant cell population of the sponge *Hymeniacidon pervele*: improved cell proliferation and spiculogenesis // Biotechnol. Bioeng. 2003b. V. 84. № 5. P. 583–590.

Zhang X., Le Pennec G., Steffen R. et al. Application of a MTT assay for screening nutritional factors in growth media of primary sponge cell culture // Biotechnol. Prog. 2004. V. 20. № 1. P. 151–155.

Zhao Q., Zhang W., Jin M. et al. Formulation of a basal medium for primary cell culture of the marine sponge *Hymeniacidon perleve* // Biotechnol. Prog. 2005. V. 21. № 3. P. 1008–1012.

Sponge Cell Reaggregation: Mechanisms and Dynamics of the Process

A. I. Lavrov and I. A. Kosevich

Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia

e-mail: lavrovai.bio@yandex.ru

Received August 6, 2013; in final form, February 20, 2014

Abstract—Sponges (Porifera) are lower metazoans whose organization is characterized by a high plasticity of anatomical and cellular structures. One of the manifestations of this plasticity is the ability of sponge cells to reaggregate after dissociation of tissues. This review brings together the available data on the reaggregation of sponge cells that have been obtained to date since the beginning of the 20th century. It considers the behavior of dissociated cells in suspension, the mechanisms and factors involved in reaggregation, and the rate and stages of this process in different representatives of this phylum. In addition, this review provides information about the histological structure of multicellular aggregates formed during reaggregation of cells and the regenerative morphogenetic processes leading to the formation of normal sponges from these multicellular aggregates.

Keywords: sponges, reaggregation of cells, primmorphs, regenerative morphogenesis