На правах рукописи

Садриев Константин Александрович

Роль генов *sfrp* при регенерации у голотурии *Eupentacta fraudatrix*

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Владивосток – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»

Научный руководитель:

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН **Долматов Игорь Юрьевич**

Официальные оппоненты:

Малашичева Анна Борисовна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, зав. лабораторией регенеративной биомедицины

Лавров Андрей Игоревич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», старший научный сотрудник Беломорской биологической станции имени Н.А. Перцова

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита диссертации состоится «20» мая 2026 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета 24.1.191.01 (Д 005.008.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.

Факс: (423)2310-900, e-mail: nscmb@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: http://www.imb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/72-sadriev-konstantin-aleksandrovich

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан «____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Ващенко М.А. Ващенко

ОБЩАЯЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Многочисленные опыты на различных животных подтвердили существование эволюционно-консервативных генетических программ активируемых морфогенами – секретируемыми сигнальными молекулами, градиент концентраций которых определяет, в каких клетках какие гены будут экспрессироваться. Морфогенетические градиенты и запускаемые ими внутриклеточные сигнальные каскады эволюционно возникли и развивались как часть межклеточной коммуникации, посредством которой клетки регулируют и синхронизируют свои функции в составе организма (Alvarado, Tsonis 2006; Ingham et al., 2011; Grall, Tschopp, 2020; Stapornwongkul, Vincent, 2021).

Одними из ключевых морфогенов являются белки семейства Wnt. Связывание Wnt с их рецепторами, приводит к активации одноименных внутриклеточных сигнальных путей, влияющих на миграцию, пролиферацию и дифференцировку различных клеток. Нарушения в передаче сигналов Wnt приводят к тяжелым патологиям развития, связанным с неправильным формированием осей тела, а также ассоциированы с различными заболеваниями, в том числе онкологическими (Steinhart, Angers, 2018; Routledge, Scholpp, 2019; Liu et al., 2022).

На функциональную активность лигандов Wnt оказывают влияние различные белки. Одними из таких модуляторов Wnt являются белки семейства секретируемых Frizzled-подобных белков – secreted Frizzled-related proteins (SFRP), способные напрямую взаимодействовать с Wnt во внеклеточном пространстве и за счет этого ингибировать или усиливать опосредуемые ими эффекты (Bovolenta et al., 2008; Petersen, Reddien, 2009; Cruciat, Niehrs, 2013).

В ходе опытов, выполненных на позвоночных, было выявлено, что SFRP выполняют важные роли во множестве морфогенетических процессов, среди которых закладка осей тела, формирование конечностей, глаз, сердца (2006; Bovolenta et al., 2008; Cruciat, Niehrs, 2013; Sugiyama et al.,2013; Guan et al., 2021).

Однако изучение их функций у позвоночных сопряжено с рядом трудностей, связанных со сложностью регуляции экспрессии генов у этих животных и дупликациями генов *Wnt* и *sfrp* в их геномах. В этой связи, для изучения функций *sfrp* в онтогенезе целесообразно использовать более просто организованные модельные организмы, у которых есть гомологи *sfrp* позвоночных.

В сравнении с позвоночными животными, иглокожие обладают потрясающими способностями к регенерации утраченных частей тела (Долматов, Машанов, 2007; Medina-Feliciano, García-Arrarás, 2021; Perillo et al., 2024). В частности, представители класса

Голотурий (Holothuroidea) широко известны благодаря их способности к эвисцерации. В стрессовых условиях животные выбрасывают во внешнюю среду часть своих внутренних органов, а затем восстанавливают утраченное. Так, голотурия *Eupentacta fraudatrix* эвисцерирует оральный комплекс органов (аквафарингеальный комплекс, АК) и весь пищеварительный тракт, за исключением клоаки. Процесс последующей регенерации занимает примерно месяц, после чего животное возвращается к полноценному питанию (Dolmatov, 1992; Долматов, Машанов, 2007).

Регенерация АК и пищеварительной трубки сопровождается активным синтезом внеклеточного матрикса, а клеточными источниками регенерации являются дифференцированные клетки, которые в период активного гистогенеза массово подвергаются дедифференцировке и трансдифференцировке. В частности, во время регенерации кишки, клетки мезодермального происхождения (целомический эпителий) подвергаются глубокой структурно-функциональной перестройке, в результате которой они могут полноценно замещать утраченные после эвисцерации клетки эндодермального происхождения (энтероциты). Участие стволовых клеток в этом процессе не доказано (Mashanov et al., 2005; Долматов, Машанов, 2007).

Голотурии, из-за высокой пластичности их эпителиев, легко проходящих через де/трансдифференцировку, и в целом ярко выраженных способностей к регенерации внутренних органов, являются перспективными объектами для изучения роли *sfrp* в восстановлении органов. До настоящего времени *sfrp* иглокожих изучались лишь в контексте эмбрионального развития (Kawai et al., 2016). Подобная работа также интересна с точки зрения выявления эволюционно-консервативных функций *sfrp* в морфогенезе у вторичноротых животных.

Таким образом, **целью** настоящего исследования является изучение роли генов *sfrp* при регенерации внутренних органов после эвисцерации у голотурии *E. fraudatrix.*

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

1) Произвести поиск и филогенетический анализ транскриптов генов *sfrp* в транскриптоме голотурии *E. fraudatrix*.

2) Изучить пространственно-временную экспрессию генов *sfrp* в ходе регенерации кишки и аквафарингеального комплекса у голотурии *E. fraudatrix*.

3) Осуществить нокдаун генов *sfrp* у голотурии *E. fraudatrix* с целью выявления их морфогенетических функций во время регенерации.

Научная новизна

Установлено наличие двух транскриптов генов *sfrp* в транскриптоме *E. fraudatrix*. Их последующий филогенетический анализ подтвердил современные представления о том, что в геноме общего предка вторичноротых присутствовало два гена *sfrp*.

Показано, что нокдаун *sfrp* приводит к дефектам формирования соединительнотканного зачатка АК. С учетом имеющихся данных о функциях SFRP у позвоночных, полученные в ходе данного исследования результаты позволяют предположить существование эволюционно-консервативной роли белков SFRP в качестве регуляторов состояния внеклеточного матрикса у вторичноротых.

Выявлено, что в ходе регенерации после эвисцерации у голотурии *E. fraudatrix* закладка соединительнотканных зачатков кишки и АК происходит независимо друг от друга. Подобное наблюдается у голотурий, для которых характерно бесполое размножение. Тем самым, полученные результаты демонстрируют сходство механизмов регенерации кишки и АК после эвисцерации и бесполом размножении у голотурий.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные дополняют имеющиеся представления о морфогенетических функциях SFRP у вторичноротых животных, о механизмах регенерации амбулакральной системы иглокожих.

Использованная в данном исследовании методика нокдауна генов у голотурии *E. fraudatrix*, в дальнейшем, с некоторыми модификациями, может быть использована для изучения функций генов в регенерации или эмбриональном развитии у других иглокожих.

Методология и методы исследования

Результаты данного исследования были получены за счет использования ряда молекулярно-генетических и гистологических методик. Для оценки дифференциальной экспрессии *sfrp в* ходе регенерации использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени и гибридизацию *in situ*. ПЦР в реальном времени, где в качестве матрицы используется кДНК, полученная с помощью реакции обратной транскрипции, позволяет проводить количественные измерения числа транскриптов исследуемых генов. С помощью гибридизации *in situ* мы изучали пространственную локализацию мРНК интересующих генов в регенератах АК и кишки.

Для выявления функций исследуемых генов осуществляли их нокдаун с помощью РНК-интерференции. Такой подход позволяет селективно ингибировать экспрессию интересующих генов за счет разрушения их мРНК. Для оценки морфологических эффектов после нокдауна получали серийные замороженные и полутонкие срезы, по которым оценивали патологические изменения.

Все исследования были выполнены на взрослых особях голотурии *E. fraudatrix* в норме или на различных стадиях регенерации после эвисцерации.

Основные положения, выносимые на защиту

1) Гены *sfrp* экспрессируются в эпителиальных клетках мезодермального происхождения во время регенерации кишки и АК у голотурии *E. fraudatrix*.

2) Гены *sfrp* вовлечены в ранние этапы формирования соединительнотканного зачатка АК.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием комплекса различных методов выполненных с применением повторностей, контролей и статистической обработки. Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы, прошли рецензирование и были опубликованы.

Личный вклад автора

Основные результаты работы получены автором лично или при его непосредственном участии. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, анализировал полученные результаты и подготавливал публикации по теме диссертации.

Апробация результатов исследования

Полученные результаты были представлены на 26 Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2023); на Всероссийской школе-конференции молодых ученых с международным участием, посвященной юбилею академика Б.Л. Астаурова (Москва, 2024).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в Web of Science и входящих в список изданий, рекомендованных ВАК.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 83 страницах, состоит из «Списка сокращений», «Введения», глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», а также «Заключения», «Выводов» и «Списка литературы», включающего 110 источников. Рукопись содержит 16 рисунков, 2 таблицы и 1 приложение.

Благодарности

Автор выражает благодарность всему коллективу Лаборатории сравнительной цитологии ННЦМБ ДВО РАН за разностороннее содействие и дружескую атмосферу. Особую благодарность выражаю своему коллеге и наставнику, Гиричу Александру Сергеевичу, за терпение и всестороннюю поддержку, обучение методам, консультирование и

дискуссию по любым вопросам. Благодарю своего научного руководителя Долматова Игоря Юрьевича за помощь и руководство на всем протяжении работы над статьями и диссертацией. Глубокую признательность выражаю коллегам с кафедры клеточной биологии и генетики ДВФУ за их упорный труд по подготовке новых поколений исследователей.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Животные

Исследования проводились на взрослых особях голотурии *E. fraudatrix*. Сбор материала осуществлялся в заливе Петра Великого Японского моря сотрудниками водолазной службы ННЦМБ ДВО РАН. Эвисцерацию у голотурий вызывали инъекцией в полость тела 1% раствора KCl на дистиллированной воде. Для получения РНК, животных вскрывали вдоль правого вентрального радиуса, вырезали зачатки органов (АК и кишка) под бинокуляром (Leica ES2) и сразу же приступали к выделению РНК. Для гистологических экспериментов, животным предварительно делали инъекцию в полость тела соответствующего фиксатора, после чего препарировали под бинокуляром и помещали нужные органы в фиксатор.

Анализ транскриптома

В секвенированном ранее транскриптоме *E. fraudatrix* (Boyko et al., 2020) был проведен поиск транскриптов генов *sfrp* с помощью программы Ugene и алгоритмов tblastn и tblastx. Множественное выравнивание найденных последовательностей и их гомологов, найденных в базах данных NCBI, производили с помощью алгоритма MUSCLE. На основе выравнивания открытых рамок считывания производили построение филогенетических деревьев с помощью метода максимального правдоподобия (Maximum Likelihood), bootstrap = 1000, модель эволюции – JTT, в программе Mega 6. Поиск белковых доменов осуществляли с помощью инструмента Conserved Domain NCBI (Conserved Domain Database, CCD).

Выделение РНК, синтез кДНК

Тотальное выделение РНК из АК и кишки проводили с помощью набора ExtractRNA (Евроген) в соответствии с протоколом производителя. Для гомогенизации материала использовали аппарат Tissue Lyser LT (Qiagen).

Синтез кДНК проводился с помощью набора MMLV RT kit (Евроген), с использованием 1мкг РНК и олиго(dT) праймеров по протоколу производителя. Реакция проходила при 37 ºС в амплификаторе C1000 Thermal Cycler (Bio Rad). После чего полученная кДНК хранилась при -20°С.

ПЦР в реальном времени

Для оценки экспрессии генов использовали кДНК полученную из АК и кишки в норме и из регенератов этих органов через 3, 5, 7, 10, 14 и 20 сутки после эвисцерации (спэ).

ПЦР осуществляли с использованием набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген). Для каждого срока регенерации использовали кДНК из 5 животных в 3 технических повторах.

Амплификация проходила в амплификаторе C1000 Thermal Cycler с CFX RT-System (Bio Rad). Результаты обрабатывались с помощью программ Bio-Rad CFX Manager 2.1 и Microsoft Excel. Данные анализировали методом $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Для проверки достоверности изменения уровня экспрессии использовали статистический метод ANOVA с дальнейшим post hoc тестом Dunnet в программе Chris Rorden's ezANOVA v 0.98. На графиках данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD).

Гибридизация *in situ*

Whole-mount in situ hybridization (WISH) осуществляли как ранее было описано (Girich, 2023). Для синтеза digoxigenin-labeled РНК зондов использовали набор DIG dNTP RNA labeling mix (Roche) и SP6/T7 РНК полимеразы (New England Biolabs).

Через 3, 5, 7, 10, 20 спэ животных фиксировали в 4% параформальдегиде (PFA). Для каждого срока регенерации брали по 3 животных. Зачатки регенерирующих органов переводили в метанол и хранили при -20°C. После регидратации и обработки протеиназой К (Евроген), зачатки инкубировали с РНК-зондами при 55°C в течение ночи. На следующий день, производили блокировку с использованием 10% овечьей сыворотки и инкубировали с alkaline phosphatase-conjugated anti-DIG antibodies (Roche) в течение ночи. На 3 день отмывали избыток антител и добавляли субстрат для щелочной фосфатазы. Окрашенные ткани хранили в 4% PFA при 4°C. Для изготовления замороженных срезов зачатки отмывали PBS, затем помещали в среду для заморозки NEG 50 (Thermo Scientific). Срезы толщиной 50 мкм получали на криостате Cryo Star HM 560 MV (Thermo Scientific) и заключали в глицерин. Для фотофиксации результатов гибридизации использовали стерео микроскоп SteREO Discovery.V12 (Carl Zeiss) и микроскоп Axio imager A2 (Carl Zeiss).

Дизайн siRNA

С помощью программы siDirect2 был осуществлен подбор small interfering RNA (siRNA) к последовательностям транскриптов *sfrp*, а также к гену домашнего хозяйства *eef1a*. Синтез siRNA осуществлялся компанией Синтол (Syntol LLC). Полученные олигонуклеотидные последовательности были разведены в Duplex Buffer (30 мМ HEPES, 100 мМ ацетат калия, pH 7.5). Для получения двухцепочечной siRNA был проведен отжиг комплементарных последовательностей: нагрев до 94°C на 2 мин и охлаждение при комнатной температуре в течение 30 мин. Полученную siRNA хранили при -20°C.

Трансфекция siRNA электропорацией

Электропорацию siRNA для каждого гена проводили дважды – через 3 и 4 спэ. Через 3 сут после последней трансфекции (7 спэ) животных фиксировали для гистологического анализа. Перед электропорацией, siRNA зонд разводили в 100 раз в буфере для электропорации (180 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1.8 мМ CaCl2, и 5 мМ HEPES, pH 7.2) до концентрации 1 мкМ. В полость тела голотурии вводили 500 мкл полученной смеси, после чего осуществляли трансфекцию с помощью электропоратора BTX ECM 830 (Harvard Apparatus). Использовали электроды BTX Genetrodes Model 508 (Harvard Apparatus).

Сразу после инъекции раствора siRNA вводили электроды в переднюю часть животного, так, чтобы один из электродов оказался в области регенерирующего АК, а второй под ним, расстояние между электродами устанавливали 5 мм.

Использовали следующие параметры тока: напряжение – 15 V; 7 импульсов длительностью 45 мс; интервал между импульсами 950 мс. Группе негативного контроля вводили буфер, содержащий неспецифическую siRNA, группе положительного контроля инъецировали siRNA для нокдауна *eef1a* и также подвергали электропорации.

Фиксация и микроскопия

Фиксацию животных после нокдауна проводили в 4% PFA, в течение суток при 4 °C, после чего материал хранили в PBS. Фиксированные образцы помещали в среду NEG 50 (RichardAllan Scientific) на 1 сут, после чего изготавливали срезы толщиной 18 мкм с помощью криостата CryoStar HM 560MV. Ткани докрашивали метиленовым синим, после чего фотографировали с помощью микроскопа Axio imager A2 (Carl Zeiss). Для конфокальной микроскопии ядра окрашивали флуоресцентным красителем DAPI. Изучение и фотографирование препаратов проводили на конфокальном микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss).

Для получения полутонких срезов материал фиксировали в 4% глутаральдегиде, обезвоживали в этаноле и ацетоне и заливали в смесь аралдита М и эпона 812 по стандартной методике. Срезы толщиной 1 мкм изготавливали на ультрамикротоме LKB, и докрашивали 1% раствором метиленового синего, после чего фотографировали с помощью микроскопа Leica DM 4500. Для построения 3D модели регенератов нервов использовали программы Slicer и ImageJ, анализируя серийно полученные замороженные срезы. Анализ полученных в ходе экспериментов фотографий проводили в программах Zeiss LSM Image Browser (Carl Zeiss), Adobe Photoshop и Image Composite Editor.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Филогения

В ходе анализа транскриптома голотурии *E. fraudatrix* были найдены транскрипты двух генов семейства *sfrp*: *sfrp1/2/5* (OL345590) и *sfrp3/4* (OL345591).

Предполагаемые белки SFRP1/2/5 и SFRP3/4 состоят из 392 и 346 аминокислот соответственно. Согласно blastp, их уровень аминокислотной идентичности ортологичным последовательностям морской звезды *Patiria pectinifera* составляет 46-47% **(Рисунок 1)**.

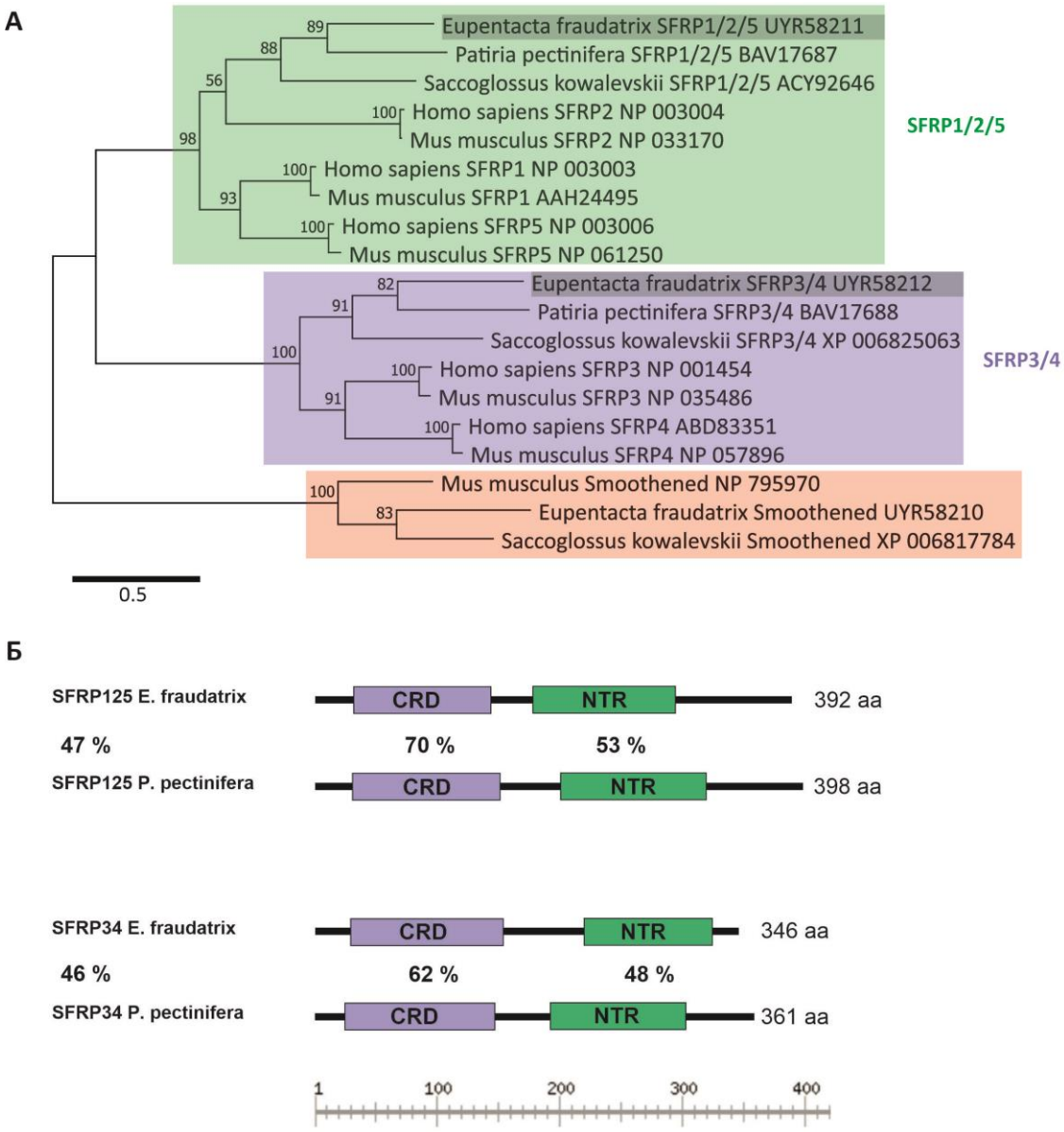

Рисунок 1 – Дендрограмма аминокислотных последовательностей SFRP вторичноротых и предполагаемая доменная организация SFRP *E. fraudatrix* и *P. pectinifera*. **(А)** Дендрограмма, построенная по методу максимального правдоподобия (Maximum likelihood). Для каждой последовательности приведен ID из NCBI. Серым выделены последовательности *E. fraudatrix*. Цифрами показана оценка статистической достоверности узла на основе bootstrap-анализа, > 50%. Шкала в количестве замен на позицию. Последовательности белков Smoothened использованы в качестве внешней группы. **(Б)** Схематическое выравнивание доменов. Процентами показан общий процент идентичных аминокислот в белках, а также по отдельным доменам.

Анализ экспрессии генов при регенерации

По данным ПЦР в реальном времени, исследуемые гены экспрессируются на всех сроках регенерации, как в кишке, так и в АК, однако их уровни экспрессии несколько отличаются **(Рисунок 2)**.

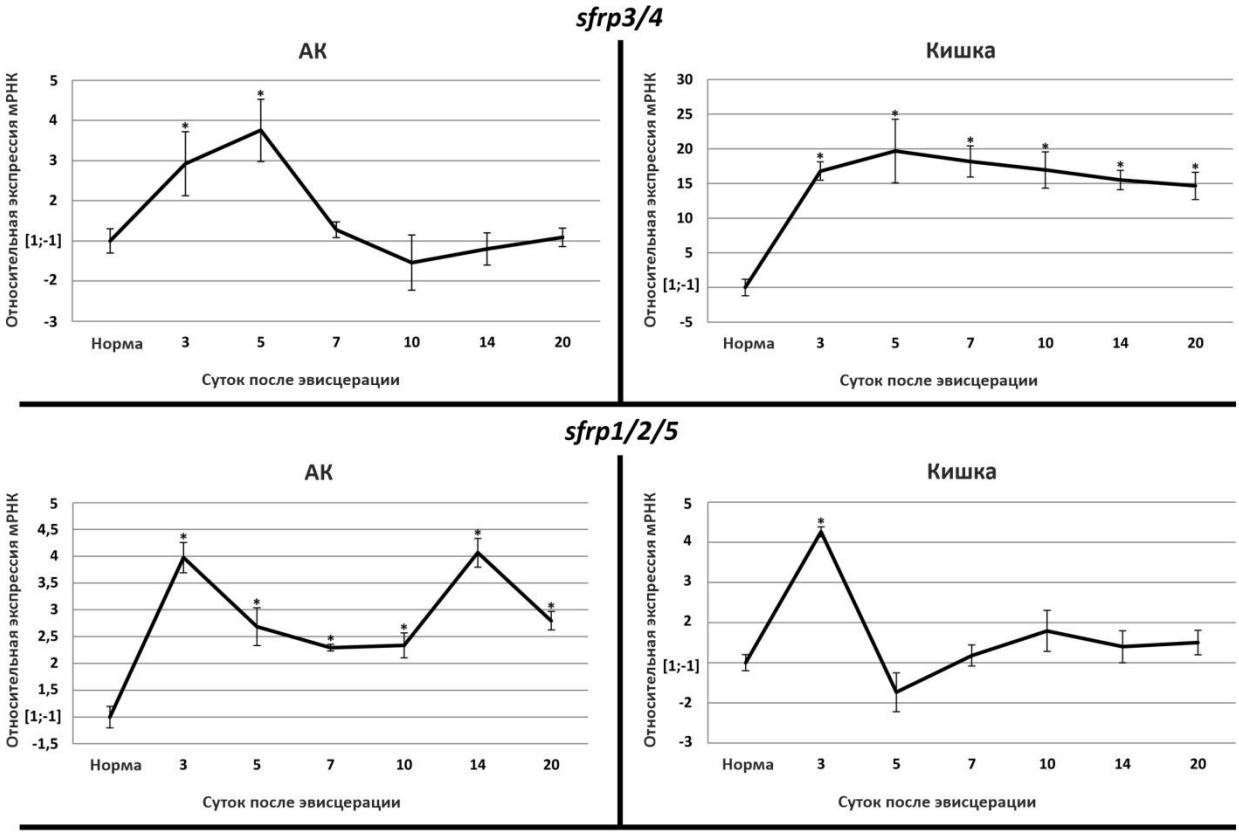

Рисунок 2 – Динамика экспрессии генов *sfpr3/4* и *sfrp1/2/5* при регенерации кишки и АК у *E. fraudatrix*. Значения нормализованы относительно среднего значения экспрессии в норме. В качестве референсных генов использовали *tubulin* и *eef1a*. Данные представлены как среднее ± SD (n = 5). *p < 0.05 (ANOVA, post hoc тест Dunnet) (По: Girich et al., 2023, с изменениями).

Так, при регенерации АК, экспрессия *sfrp3/4* увеличивается через 3 спэ и достигает максимальных значений через 5 спэ (в 3.5 раза выше нормы). В дальнейшем экспрессия этого гена резко снижается и не отличается от нормы вплоть до 20 спэ. Количество транскриптов *sfrp1/2/5* через 3 спэ увеличивается в 4 раза, и держится выше нормы до конца эксперимента, уменьшаясь через 7 спэ и снова увеличиваясь через 14 спэ.

Через 3 спэ в зачатке кишки происходит возрастание количества транскриптов исследуемых генов. Количество транскриптов *sfrp3/4* резко увеличивается, (в 19 раз относительно нормы) и сохраняется на высоком уровне на всем протяжении регенераторного процесса. Ген *sfrp1/2/5* в этот период увеличивают экспрессию в 3-4 раза, а затем, через 5 спэ

экспрессия возвращается к уровню нормы и сохраняет подобные значения в течение всего эксперимента.

Согласно данным гибридизации, *sfrp3/4* экспрессируется в клетках целомического эпителия мезентерия через 5 спэ и в дальнейшем детектируется там вплоть до 20 спэ **(Рисунок 3)**. При регенерации АК, через 5 спэ экспрессия отмечается во внутреннем (амбулакральном) эпителии раздвоенных концов радиальных амбулакральных каналов, на этих сроках регенерации постепенно растущих навстречу друг к другу. Через 7 спэ транскрипты *sfrp3/4* маркируют полностью замкнувшийся амбулакральный кольцевой канал, а через 10 спэ они детектируются в зачатках полиевых пузырей. Кроме того, транскрипты *sfrp3/4* присутствуют в клетках целомического эпителия мезентерия и интеррадиальных участков АК. Через 20 спэ экспрессия сохраняется только в целомическом эпителии АК и мезентерия.

Транскрипты *sfrp1/2/5* через 3 спэ локализуются в целомическом эпителии кишечного мезентерия и интеррадиусов зачатка АК. При этом в передней части АК, где клетки целомического эпителия еще не дедифференцировались, продукты *sfrp1/2/5* выявляются как в перитонеальных, так и миоэпителиальных клетках. Об этом свидетельствуют 2 зоны экспрессии, различимые на замороженных срезах. Целомический эпителий голотурий является однослойным многорядным, его базальная часть представлена в основном миоэпителиальными клетками, а апикальная часть перитонеоцитами (Mashanov et al., 2005; Dolmatov, 2021). Соответственно нижняя зона экспрессии соответствует цитоплазме миоэпителиальных клеток, верхняя – цитоплазме перитонеоцитов. Через 5-7 спэ *sfrp1/2/5* экспрессируется в клетках, которые маркируют широкую полосу в районе развития амбулакрального кольцевого канала. Через 10 спэ, транскрипты *sfrp1/2/5* находятся в целомическом эпителии всей задней части зачатка АК и переднего зачатка кишки. Кроме того, продукты этого гена также обнаруживаются в радиальных амбулакральных каналах зачатка АК, переходящих на стенку тела. Через 20 спэ транскрипты *sfrp1/2/5* обнаруживаются в амбулакральном и целомическом эпителиях амбулакрального кольца и его производных – полиевых пузырях. Также он экспрессируется в концевых участках радиальных амбулакральных каналов и отходящих от них щупальцевых каналах, сохраняется экспрессия в целомическом эпителии кишки.

Нокдаун генов

При электропорации флуоресцентномеченного РНК-FAM зонда, либо неспецифической siRNA, размер и морфология АК через 7 спэ соответствуют нормальной регенерации (**Рисунок 4А, Б**). Видна формирующаяся амбулакральная система с кольцевым амбулакральным каналом и щупальцевыми каналами (**Рисунок 4А, Б, В**). Строение АК

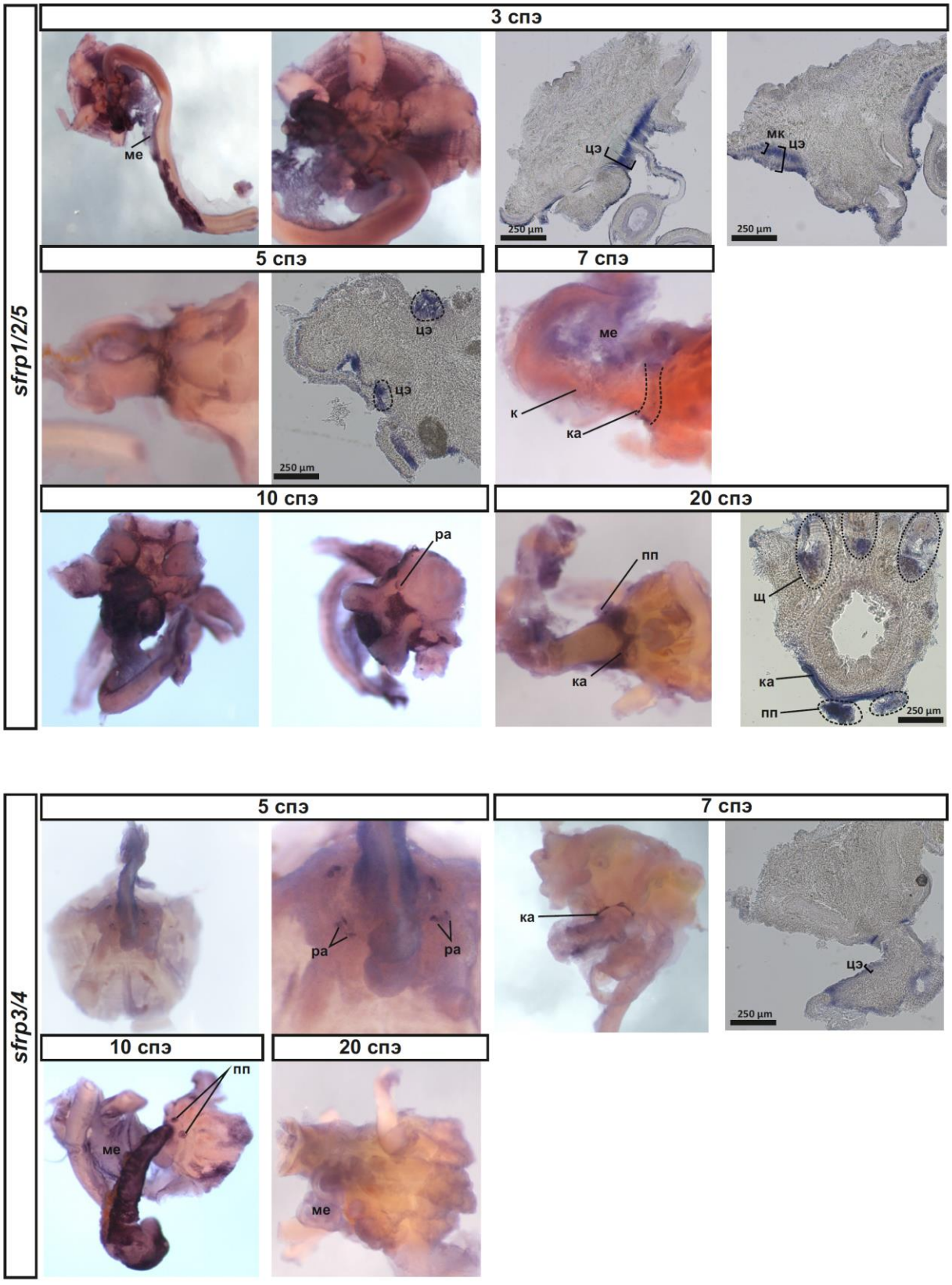

Рисунок 3 – Паттерны экспрессии *sfrp* при регенерации кишки и АК у *E. fraudatrix*. Условные обозначения: к – кишка, ка – кольцевой амбулакральный канал, мк – миоэпителиальные клетки пп – полиев пузырь, ра – радиальный амбулакральный канал, цэ – целомический эпителий; щ – щупальцевый канал. Для замороженных срезов приведен масштаб, 250 мкм (По: Sadriev, 2025, с изменениями).

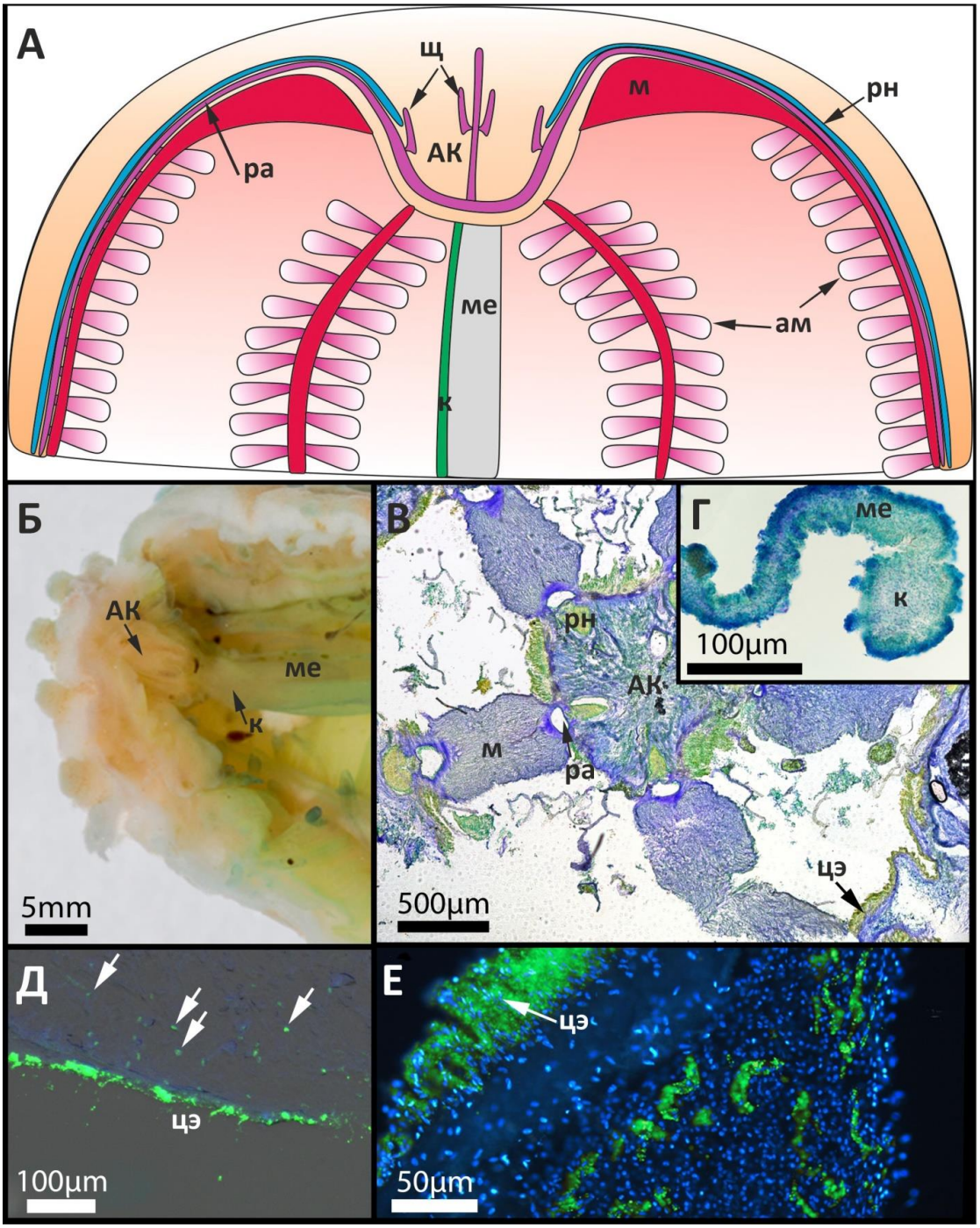

Рисунок 4 – Строение регенерирующих АК и кишки после электропорации с контрольной неспецифической siRNA **(А-Г)** и FAM зондом **(Д-Е)** через 7 спэ. **(А)** Схема регенерата АК и кишки. **(Б)** Общий вид регенерата, окраска метиленовым синим. **(В)** Поперечный срез зачатка АК, окраска метиленовым синим. **(Г)** Поперечный срез кишки, окраска метиленовым синим. **(Д)** FAM зонд в клетках целомического эпителия и одиночных клетках в АК (указаны стрелкой). **(Е)** FAM зонд в клетках целомического эпителия и соединительной ткани стенки тела. Условные обозначения: АК – зачаток аквафарингеального комплекса, ам – ампулы амбулакральных ножек, к – кишка, м – мышца, ме – кишечный мезентерий, ра – радиальный амбулакральный канал, рн – радиальный нерв, цэ – целомический эпителий, щ – щупальцевые каналы. **В-Е** – замороженные срезы (По: Girich et al., 2023, с изменениями).

типично для данной стадии регенерации (**Рисунок 4В**). Кишка также развивается нормально (**Рисунок 4Г**) и соединяется с АК.

При выбранных параметрах электропорации (см. гл. 2.8 диссертации) зонд с FAM меткой обнаруживался в клетках целомического эпителия, гиподерме стенки тела и соединительной ткани регенерирующих органов (**Рисунок 4Д, Е**).

Нокдаун sfrp3/4

При нокдауне *sfrp3/4* зачаток АК не сформирован **(Рисунок 5А-В)**, однако присутствует зачаток кишки в виде соединительнотканного утолщения по краю мезентерия **(Рисунок 5Г)**. В концевых отделах амбулакров сохраняются только целомический эпителий и радиальный нервный тяж, а соединительная ткань разрушается и местами отсутствует **(Рисунок 5В)**. У некоторых голотурий (3 из 5) наблюдается асимметрия формирующегося регенерата АК. Построенная 3D модель радиальных нервов показывает, что зачаток АК закладывается, загибаясь к вентральной стороне животного **(Рисунок 5Д)**. Нервы и мышцы рядом с мезентерием укорочены. Такого эффекта не наблюдается при нокдауне других генов.

Нокдаун sfrp1/2/5

При нокдауне *sfrp1/2/5* между концами амбулакров формируется соединительнотканный зачаток АК, однако, с отставанием от нормального развития **(Рисунок 6А)**. Его длина в два раза короче таковой у контрольных животных и составляет 2 мм **(Рисунок 6Б)**. В формирующемся АК отсутствуют зачатки органов амбулакральной и нервной систем – каналы щупалец, кольцевой амбулакральный канал, нервное кольцо **(Рисунок 6А, В)**. По краю мезентерия развивается зачаток кишки в виде соединительнотканного утолщения **(Рисунок 6Г)**. В центральной части регенерата обнаружена область плотной соединительной ткани **(Рисунок 6Д)**.

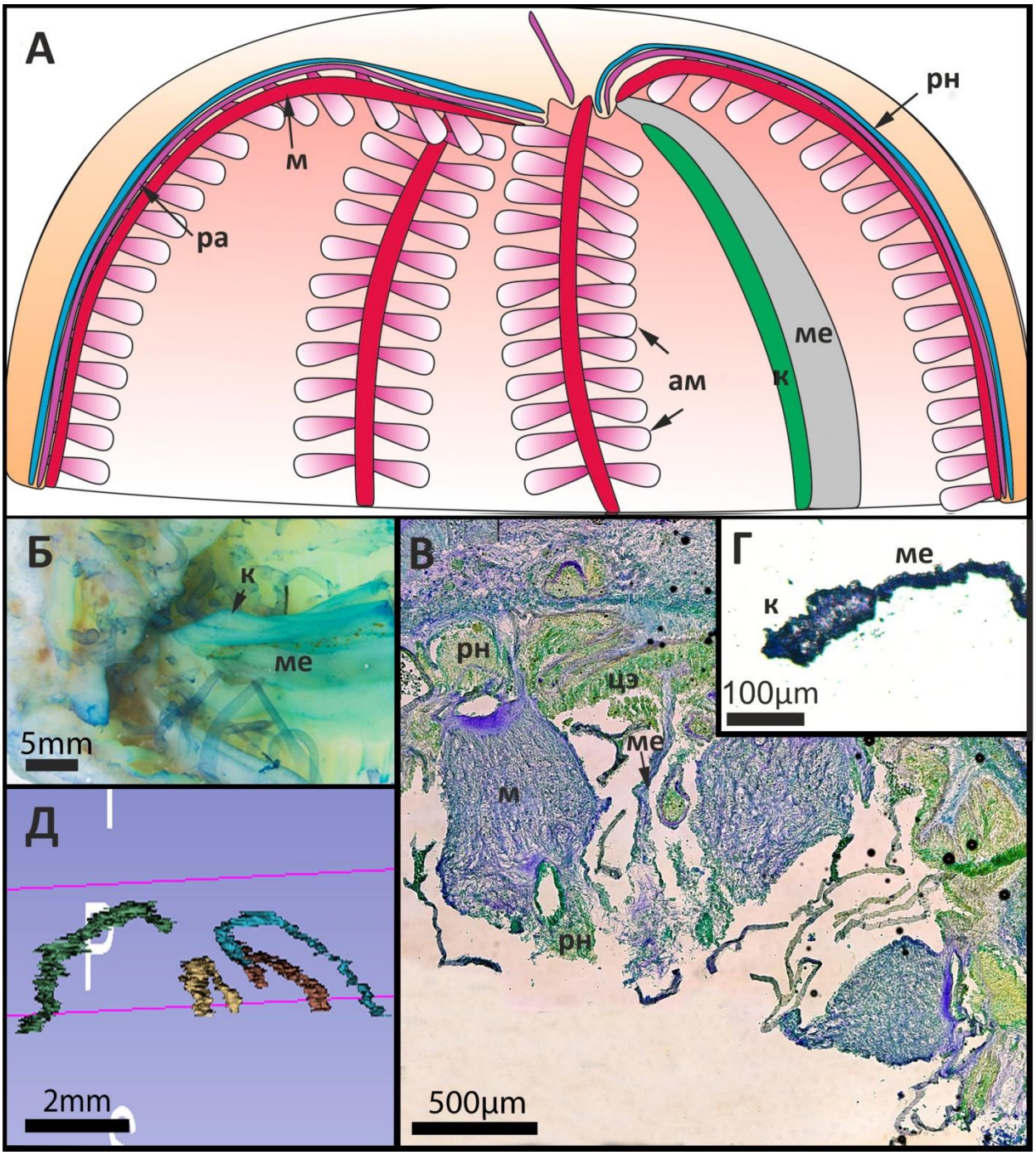

Рисунок 5 – Нарушения регенерации после нокдауна *sfrp3/4*. **(А)** Схема зачатка АК после нокдауна. **(Б)** Общий вид зачатков АК и кишки, окраска метиленовым синим. **(В)** Поперечный срез зачатка АК, окраска метиленовым синим. **(Г)** Поперечный срез кишки, окраска метиленовым синим. **(Д)** 3D модель радиальных нервов, переходящих со стенки тела на зачаток АК. Условные обозначения: ам – ампулы амбулакральных ножек, к – кишка, м – мышца, ме – кишечный мезентерий, ра – радиальный амбулакральный канал, рн – радиальный нерв, цэ – целомический эпителий. **В**, **Г** – замороженные срезы (По: Girich et al., 2023, с изменениями).

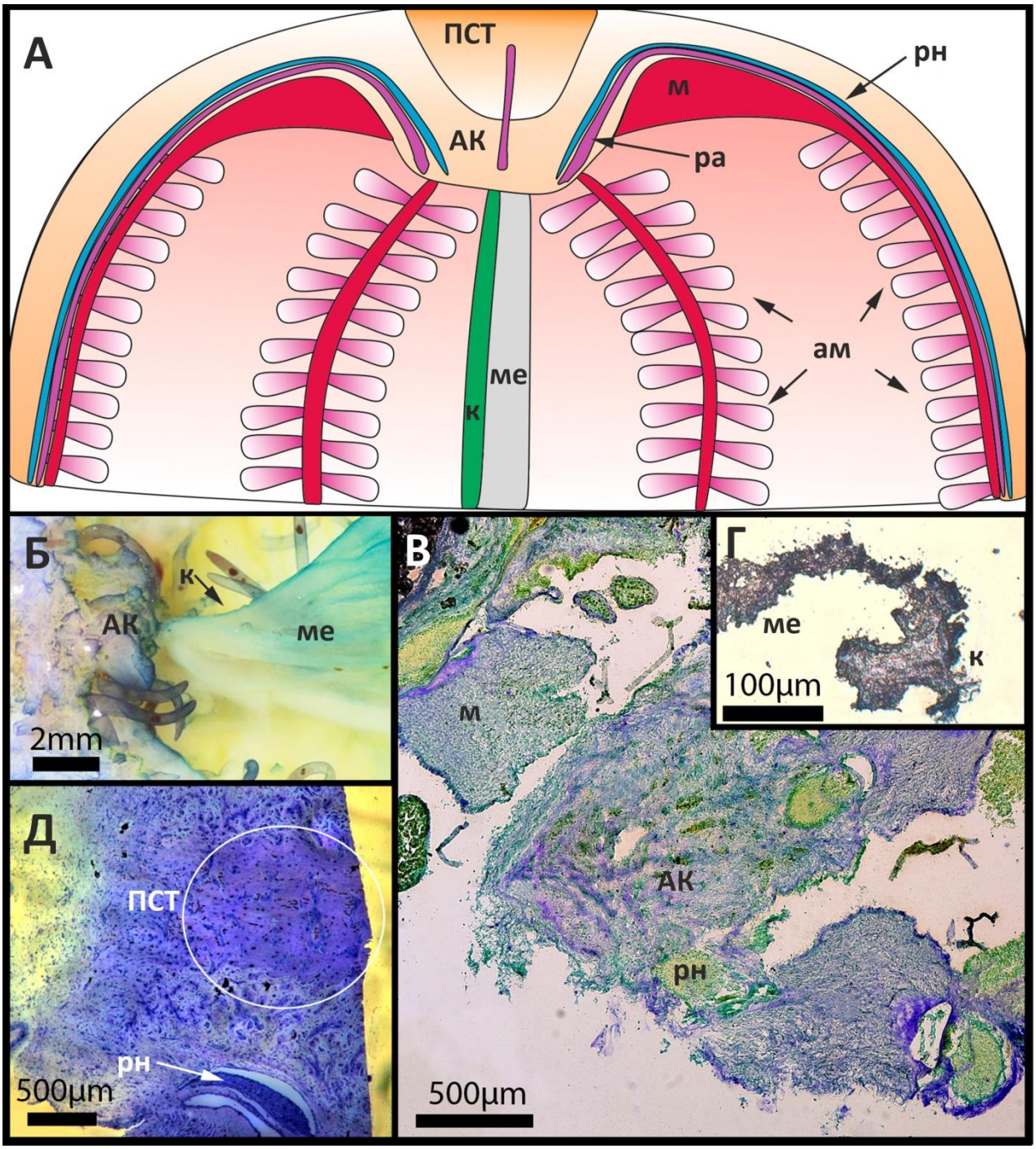

Рисунок 6 – Нарушения регенерации после нокдауна *sfrp1/2/5*. **(А)** Схема зачатка АК после нокдауна. **(Б)** Общий вид зачатков АК и кишки, окраска метиленовым синим. **(В)** Поперечный срез зачатка АК, окраска метиленовым синим. **(Г)** Поперечный срез кишки. **(Д)** Срез зачатка АК с плотным соединительнотканным образованием, окраска метиленовым синим. Условные обозначения: АК – зачаток аквафарингеального комплекса, ам – ампулы амбулакральных ножек, к – кишка, м – мышца, ме – кишечный мезентерий, ра – радиальный амбулакральный канал, рн – радиальный нерв, ПСТ – плотная соединительная ткань. **В**, **Г** – замороженные срезы, **Д** – полутонкий срез (По: Girich et al., 2023, с изменениями).

Обсуждение

Наше исследование показало, что у *E. fraudatrix* имеется 2 представителя семейства *sfrp: sfrp3/4* и *sfrp1/2/5*, что, по-видимому, характерно для иглокожих (Leclère, Rentzsch, 2012; Yan et al., 2014; Kawai et al., 2016). Кодируемые данными генами белки SFRP имеют типичную для членов данного семейства доменную организацию – состоят из 2 доменов: CRD и NTR.

Изменения уровня экспрессии исследуемых генов показывают, что они вовлечены в процессы регенерации. Оба этих гена увеличивают экспрессию в регенерирующем АК через 3-5 спэ. В это время у голотурий идет активная дедифференцировка и миграция клеток целомического эпителия стенки тела и структур амбулакра (Dolmatov, 1992). Кроме того, в этот период начинает закладываться зачаток кишки в виде соединительнотканного утолщения.

По данным WISH, во время регенерации у *E. fraudatrix sfrp* экспрессируются исключительно в мезодермальных производных, в первую очередь в целомическом эпителии **(Рисунок 7)**.

Потенциально, SFRP могут участвовать в регуляции пролиферации, миграции и дифференцировке и/или дедифференцировке клеток целомического и амбулакрального эпителиев через переключение сигнальных путей Wnt. Во время регенерации после эвисцерации дедифференцированные клетки целомического эпителия мигрируют со стенки тела на зачатки АК и кишки (Долматов, Машанов 2007). Дедифференцировка клеток целомического сопровождается существенной перестройкой цитоскелета клеток – миоэпителиальные клетки теряют свои миофиламенты, а перитонеоциты разрушают промежуточные филаменты. Только после такой перестройки клетки целомического эпителия приобретают способность к миграции (Mashanov, García-Arrarás, 2011; Dolmatov, 2021). Ранее, в опытах с эксплантами кишки голотурии *Holothuria glaberrima* было продемонстрировано, что канонический Wnt сигналинг регулирует пролиферацию клеток экспланта (Alicea-Delgado, García-Arrarás, 2021; Medina-Feliciano, García-Arrarás, 2021).

В наших экспериментах нокдаун генов *eef1a, sfrp3/4* и *sfrp1/2/5* не влиял на ранние этапы развития пищеварительной системы. Вне зависимости от того, какой ген отключался, зачаток кишки в виде соединительнотканного утолщения формировался по краю мезентерия.

Ранее считалось, что поскольку зачаток кишки берет начало от растущего АК то, соответственно, его восстановление зависит от АК (Dolmatov 1992; Mashanov et al., 2004; Mashanov, Garcia-Arraras, 2011). Однако формирование зачатка кишки при нарушении развития АК говорит о том, что механизмы формирования соединительнотканных зачатков кишки и АК достаточно независимы и запускаются разными индукторами. У голотурий с

бесполым размножением, после разделения пополам в заднем фрагменте голотурий АК и передняя часть кишки регенерируют независимо друг от друга (Dolmatov, 2014; Kamenev, Dolmatov, 2017; Dolmatov, 2020).

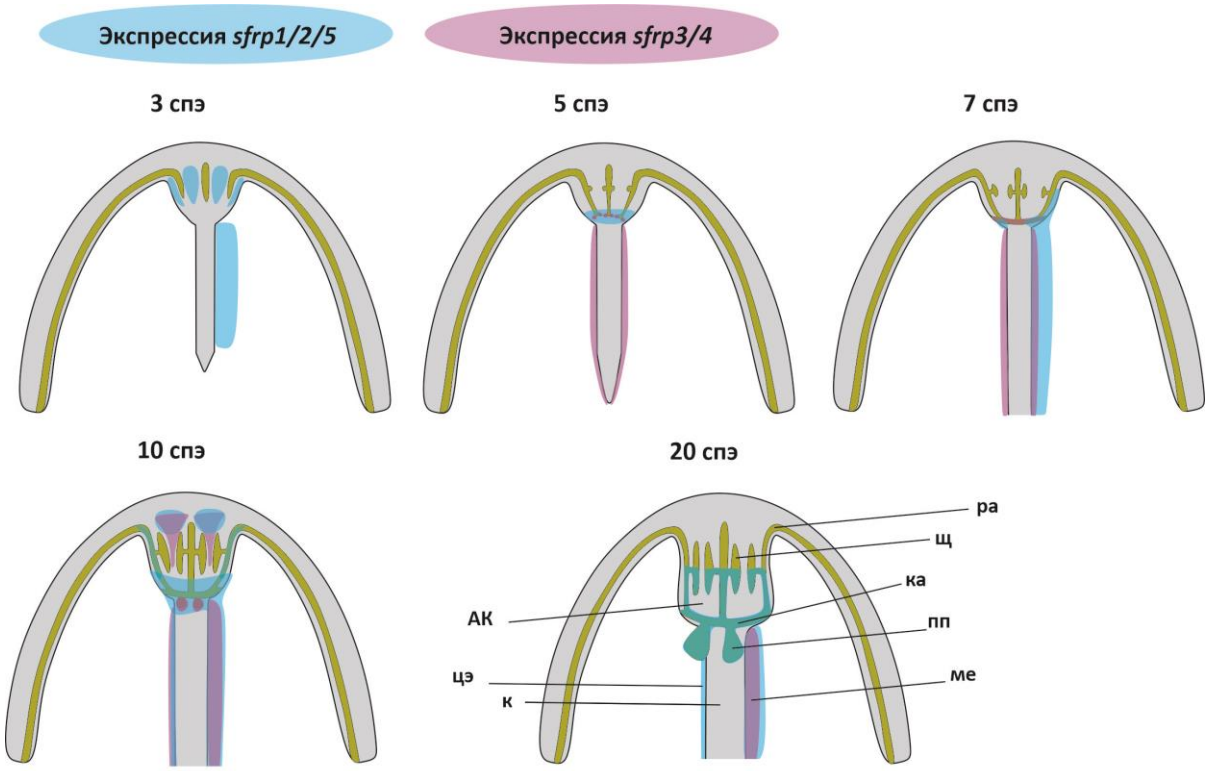

Рисунок 7 – Схема паттернов экспрессии *sfrp*. Транскрипты обоих генов присутствуют в клетках целомического и амбулакрального эпителиев. Целомический эпителий выстилает поверхность кишки, АК и мезентерия. Амбулакральный эпителий выстилает внутреннюю поверхность кольцевого амбулакрального канала, полиевых пузырей и радиального амбулакрального канала, который переходит в щупальцевые каналы. Условные обозначения: АК – зачаток аквафарингеального комплекса, к – кишка, ка – кольцевой амбулакральный канал, ме – кишечный мезентерий, ра – радиальный амбулакральный канал, пп – полиев пузырь, цэ – целомический эпителий, щ – щупальцевый канал (Из Sadriev, 2025, с изменениями).

Эффект от нокдауна *sfrp3/4* можно попытаться объяснить сверхэкспрессией и/или гиперактивацией матриксных металлопротеиназ (ММП) секретируемых целомическим и амбулакральным эпителиями, в результате чего в концевых отделах амбулакров соединительная ткань практически полностью отсутствует и не формируется кольцевой амбулакральный канал.

Кроме того, *sfrp3/4* через 5 спэ маркирует места раздвоения амбулакральных каналов, где как раз должен происходить активный ремоделинг внеклеточного матрикса (ВКМ)

(Рисунок 7), для того чтобы концы амбулакральных каналов могли расти навстречу друг другу и формировать единый амбулакральный кольцевой канал.

Еще одним эффектом от нокдауна *sfrp3/4* стало нарушение симметрии формирования зачатка АК. Ввернутые амбулакры прижимаются в вентральной стороне, ближе к мезентерию. Такой эффект вполне ожидаем, так как Wnt сигналинг регулируют симметричность гистогенеза как при эмбриональном развитии, так и при регенерации (Moon et al., 1997; Petersen, Reddien, 2009; Reddien, 2018 Steinhart, Angers, 2018).

Эффект от нокдауна *sfrp1/2/5* напоминает частичную блокировку металлопротеиназ с помощью 1,10-phenanthroline у голотурий (Lamash, Dolmatov, 2013). Зачаток АК формируется, однако с отставанием от развития АК у контрольных животных в группе негативного контроля, в результате чего через 7 спэ в нем еще не сформировались кольцевой амбулакральный канал и щупальцевые каналы.

Существуют данные, что SFRP2 млекопитающих, ортолог SFRP1/2/5 голотурий, способен дозозависимым образом препятствовать накоплению коллагена I типа в инфарктных тканях. Инъекция SFRP2 в сердце крыс, пораженное инфарктом миокарда, оказывала антифиброзной эффект, что приводило к уменьшению зоны инфаркта (He et al., 2010). Возможно, что у голотурий *sfrp1/2/5*, подобно своему ортологу, оказывает антифиброзный эффект, который снимается после нокдауна этого гена, что приводит к избыточному накоплению коллагена в ВКМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании мы попытались выявить функции генов *sfrp* в регенерации после эвисцерации у голотурии *E. fraudatrix*. Нам удалось идентифицировать в ее транскриптоме транскрипты двух *sfrp*, являющихся ортологами *sfrp1, -2, -5* и *sfrp3, -4* млекопитающих. Полученные данные согласуются с другими работами, согласно которым в геноме общего предка вторичноротых присутствовало два гена *sfrp*: *sfrp1/2/5* и *sfrp3/4* (Leclère, Rentzsch, 2012; Yan et al., 2014).

Мы также изучили пространственно-временную динамику экспрессии *sfrp*, в результате удалось продемонстрировать, что *sfrp* дифференциально экспрессируются в целомическом и амбулакральном эпителиях, а значит, потенциально могут быть вовлечены в регенерацию внутренних органов у голотурий. Для проверки данного предположения мы адаптировали методику нокдауна генов с помощью РНК-интерференции для *E. fraudatrix* и применили ее в отношении *sfrp*.

Основным результатом нокдауна *sfrp1/2/5* стало формирование участка плотной соединительной ткани в регенерате АК на 7 спэ. По данным полученным в ходе анализа серийных замороженных срезов было продемонстрировано, что вследствие нокдауна не формируется кольцевой амбулакральный канал.

Из-за нокдауна *sfrp3/4* также не формируется кольцевой амбулакральный канал, наблюдаются дефекты формирования соединительной ткани. Соединительнотканный зачаток АК практически отсутствует. Еще одним результатом нокдауна данного гена стало нарушение симметрии регенерации АК.

С учетом имеющихся данных о способности SFRP регулировать фиброз и активность ММП в тканях позвоночных и тем, что эффект от нокдауна *sfrp1/2/5* схож с эффектом от применения ингибиторов металлопротеиназ, мы предполагаем, что при регенерации АК целомический и амбулакральный эпителии в которых экспрессируются *sfrp* с их помощью регулируют состояние ВКМ регенерирующего АК.

Неожиданным побочным результатом опытов с нокдауном стало то, что, несмотря на отсутствие в некоторых случаях соединительнотканного утолщения – регенерата АК, соединительнотканное утолщение по краю мезентерия – регенерат кишки, все же формировалось. Это свидетельствует о том, что закладка АК и кишки у *E. fraudatrix* происходит независимо, подобно тому, что можно наблюдать у голотурий размножающихся бесполым путем (Kamenev, Dolmatov, 2017).

ВЫВОДЫ

1. В транскриптоме голотурии *E. fraudatrix* присутвуют транскрипты двух генов *sfrp*: *sfrp3/4* и *sfrp1/2/5*, которые являются ортологами генов *sfrp3*, *sfrp4* и *sfrp1*, *sfrp2*, *sfrp5* млекопитающих соответственно.
2. При регенерации кишки и аквафарингеального комплекса у голотурии *E. fraudatrix* гены *sfrp* экспрессируются в клетках целомического и амбулакрального эпителиев.
3. Нокдаун гена *sfrp3/4* приводит к разрушению соединительной ткани зачатка аквафарингеального комплекса у голотурии *E. fraudatrix*. Кроме того, снижение его экспрессии ведет к нарушению симметрии формирования зачатка и отсутствию восстановления кольцевого амбулакрального канала и щупальцевых каналов.
4. Нокдаун гена *sfrp1/2/5* ведет к формированию плотной соединительной ткани в зачатке аквафарингеального комплекса у голотурии *E. fraudatrix*, что препятствует развитию его внутренних структур – кольцевого амбулакрального канала и щупальцевых каналов.
5. При отсутствии регенерата аквафарингеального комплекса, соединительнотканный зачаток кишки все же формируется, что указывает на независимые механизмы закладки этих структур у голотурии *E. fraudatrix*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. Girich A., **Sadriev K.,** Frolova L., Dolmatov I. Role of *smoothened* and *sfrp* genes in *Eupentacta fraudatrix* regeneration // Wound Repair and Regeneration. 2023. Vol. 31, №. 4, P. 464–474. DOI: 10.1111/wrr.13097.

2. **Sadriev K.** Expression patterns of *sfrp* genes during regeneration in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // Genesis. 2025. Vol. 63, №. 4. Article no. e70023. DOI: 10.1002/dvg.70023.

3. **Sadriev K.** Secreted Frizzled-related proteins in animal development // Histochemistry and Cell Biology. 2025. Vol. 163. Article no. 80. DOI: 10.1007/s00418-025-02415-z.

Тезисы конференций:

1. **Садриев К.А.**, Гирич А.С. Трансфекция siRNA в клетки голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Сборник тезисов 26 Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века», 9–13 апреля 2023 г., г. Пущино. – Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. С. 109.

2. **Садриев К.А.**, Гирич А.С. Экспрессия генов *sfrp* при регенерации у голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Сборник тезисов Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной юбилею академика Б.Л. Астаурова «Генетика и индивидуальное развитие», 29–31 октября 2024 г., и Школы-конференции «Генетические модификации и анализ генома клеток», 31 октября – 1 ноября 2024 г., г. Москва, ИБР РАН. – М.: Издательство «Перо», 2024. С. 74.

Садриев Константин Александрович

Роль генов *sfrp* при регенерации у голотурии *Eupentacta fraudatrix*

1.5.22. Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук