

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Никитенко Екатерина Дмитриевна

**«Тонкая морфология, развитие и регенерация спиккулярного комплекса
Onchidoris muricata (Doridina, Nudibranchia, Mollusca)»**

Специальность 1.5.12 Зоология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.б.н. Ворцепнева Елена Владимировна

МОСКВА – 2025

Оглавление

1 Введение	4
1.1 Актуальность темы исследования и степень ее разработанности	4
1.2 Цели и задачи	5
1.3 Научная новизна	5
1.4 Объект и предмет исследования	6
1.5 Теоретическая и практическая значимость работы	7
1.6 Методология и методы исследования	8
1.7 Положения, выносимые на защиту	8
1.8 Личный вклад автора	8
1.9 Степень достоверности и апробация результатов	9
1.10 Структура и объем работы	12
1.11 Благодарности	12
1.12 Обзор литературы	13
1.12.1 Разнообразие спикул беспозвоночных	14
1.12.2 Регенерация кальцитовых структур у беспозвоночных	18
1.12.3 Разнообразие спикул у Mollusca	20
2 Материал и методы исследования	26
2.1 Сбор материала. Прижизненные наблюдения	26
2.2 Изучение общей морфологии спикульного комплекса	26
2.3 Изучение морфологии отдельных спикул	27
2.3.1 Внешняя морфология спикул	27
2.3.2 Внутренняя морфология спикул	28
2.4 Химический состав спикул	29
2.5 Минерализация спикул	30
2.6 Иммуногистохимия и флуоресцентное окрашивание	30
2.7 Методы изучения молекулярных механизмов минерализации	31
2.7.1 Синтез антисмыслового РНК зонда. <i>In situ</i> гибридизация	31
2.8 Изучение регенерации спикульного комплекса	33
3 Результаты	35
3.1 Преобразование нормального строения тела <i>Onchidoris muricata</i>	35
3.2 Преобразование спикул <i>Onchidoris muricata</i>	36
3.2.1 Спикульный комплекс	36
3.2.2 Преобразование стенки тела	37
3.2.3 Преобразование склероцитов	40
3.2.4 Внутренняя морфология спикул	41
3.2.5 Химический состав спикул	42
3.2.6 Минерализация спикул	43
3.2.7 Молекулярные механизмы минерализации. <i>In situ</i> гибридизация	43

3.3 Регенерация.....	44
3.3.1 Внутреннее строение нормального ринофора.....	44
3.3.2 Механизм работы нормального ринофора.....	45
3.3.3 Подбор оптимальной модели регенерации.....	46
3.3.4 Регенерация ринофора.....	46
4 Обсуждение.....	51
4.1 Онтогенетическая динамика покровов.....	51
4.2 Органический и минеральный состав спикул.....	56
4.3 Молекулярные механизмы минерализации. <i>In situ</i> гибридизация.....	58
4.4 Регенерация.....	59
5 Заключение.....	65
6 Выводы.....	68
7 Список цитируемой литературы.....	69
8 Приложение.....	81
8.1 Таблицы.....	81
8.1.1 Таблицы к главе «Введение».....	81
8.1.2 Приложения к главе «Методология и методы исследования».....	84
8.1.3 Приложения к главе «Результаты».....	86
8.2 Иллюстративный материал.....	97
8.2.1 Иллюстративный материал к главе «Введение».....	97
8.2.2 Иллюстративный материал к главе «Результаты».....	104
8.2.3 Иллюстративный материал к главе «Обсуждение».....	170
8.3 Протоколы.....	172
8.3.1 Протоколы для микроскопических исследований.....	172
8.3.2 Протоколы фиксаций.....	173
8.3.3 Протоколы для проведения молекулярных исследований.....	175
8.3.4 Протокол синтеза зондов для <i>in situ</i> гибридизации.....	178
8.3.5 Праймеры и последовательности гена интереса.....	182

1 Введение

1.1 Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Спикулы — скелетные элементы, которые встречаются в самых разных группах живых организмов, от одноклеточных до хордовых. Формирование спикул большинства животных напрямую связано с процессом биоминерализации — образованием твердых минеральных структур внутри биологических систем. Исследование биоминерализации, в том числе поиск новых модельных объектов, является одной из актуальных тем современной биологии. Изучение механизмов биоминерализации и регуляции этого процесса, в том числе на молекулярном уровне, важно для понимания путей эволюции опорных структур в разных группах эукариот, а также для разработки новых биокompозитных материалов и биотехнологий.

Большинство известных в настоящее время спикул беспозвоночных животных являются внеклеточными образованиями, подобно другим скелетным элементам, например, раковине моллюсков, экзоскелетам членистоногих, внутренним скелетам вторичноротых животных, включая иглокожих. Несмотря на широкое распространение спикул, данные по их морфологии, формированию, минерализации и регенерации в основном существуют для модельных и коммерчески ценных видов (некоторых губок и морских ежей), а большая часть разнообразия биоминеральных структур остается вовсе не изучена. Одним из таких примеров являются спикулы безраковинных брюхоногих моллюсков, в частности, *Doridina* (*Nudibranchia*, *Heterobranchia*), которые располагаются внутриклеточно под покровным эпителием (субэпидермально). Такое положение спикул является исключительным для моллюсков, все изученные скелетные элементы которых имеют эктодермальное происхождение и располагаются внеклеточно снаружи от покровного эпителия. Внутриклеточное положение спикул уникально не только для моллюсков, но и для всех беспозвоночных животных в целом, и вызывает особый интерес для изучения.

Doridina – это широко распространённая группа морских голожаберных моллюсков, насчитывающая более 2000 видов. Наличие субэпидермальных спикул в их покровах показано более ста лет назад (Alder, Hancock, 1855; Prenant, 1924). Несмотря на это, в настоящее время данные о внутриклеточных спикулах ограничиваются описанием химического состава и внешней морфологии. Известно, что спикулы состоят из различных форм карбоната кальция, также без подробностей упоминается наличие примесей магния и органических веществ (Woodland, 1907; Odum, 1951; Cattaneo-Vietti et al., 1995; Weiner et al., 2003). Однако точные изоформы карбоната кальция не установлены и требуют верификации

с применением современных методов. Внешняя морфология спикул известна лишь для 20 видов дорид, данные об особенностях их внутреннего строения – вовсе только для 13 видов. Процессы формирования, роста, минерализации и регенерации внутриклеточных спикул до сих пор вовсе не изучены.

Внутриклеточные спикулы представляют особый интерес для исследования, поскольку являются уникальными среди многоклеточных животных. Именно комплексный подход к анализу онтогенетической динамики морфологии спикул, их химического состава, процесса минерализации и регенерации, позволит не только ответить на фундаментальные вопросы о происхождении и эволюции армированных структур животных, но и найти применение в прикладных направлениях науки, таких как материаловедение, биотехнология и медицина.

1.2 Цели и задачи

Настоящая работа посвящена изучению субэпидермальных внутриклеточных спикул на примере голожаберного моллюска *Onchidoris muricata* (Doridina, Nudibranchia).

Цель работы — провести анализ особенностей морфологии, процесса формирования спикул *Onchidoris muricata* (Doridina, Nudibranchia) с момента их закладки в онтогенезе и при репаративной регенерации на морфологическом и молекулярном уровнях.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) изучить развитие спикул и формирование спикульного комплекса;
- 2) изучить общую морфологию, гистологию и ультраструктуру спикул и покровного эпителия на постличиночных этапах развития;
- 3) изучить химический состав спикул;
- 4) выявить особенности регуляции процесса минерализации спикул;
- 5) изучить процесс репаративной регенерации ринофоров, папилл и спикул в них.

1.3 Научная новизна

Настоящая работа является первым комплексным исследованием преобразования субэпидермальных спикул моллюсков в процессе онтогенеза на примере голожаберного моллюска *Onchidoris muricata*. Изучение онтогенетической динамики стенки тела (покровов и спикул в них) позволило впервые: 1) выделить ключевые стадии

преобразования покровов и спикул; 2) обнаружить, ранее не описанные Икс клетки в базальной части эпителия, которые согласно исследованиям гистологического и ультратонкого строения, вероятно, являются предшественниками спикул; 3) выявить единовременное формирование пула спикул и образования спикульных трактов на ранних ювенильных стадиях *O. muricata* после метаморфоза, с дальнейшим лишь увеличиваются; 4) изучить морфологию специализированных клеток, формирующих спикулы – склероцитов; 5) описать внутриклеточное положение спикул в вакуоли склероцита на всех стадиях постличиночного развития; 6) изучить процесс созревания спикул, изменения их элементного и химического состава; 7) определить зоны кальцификации спикул на разных стадиях развития *O. muricata*.

В рамках данной работы впервые достоверно определен химический состав спикул *O. muricata*. Получены оригинальные данные о вероятных молекулярных механизмах регуляции кальцификации внутриклеточных спикул моллюсков. Методом *in situ* гибридизации визуализированы паттерны экспрессии карбоангидразы во время спиккулогенеза на разных стадиях онтогенеза.

Получены первые данные о регенеративных потенциях спикульных органов Doridina – ринофоров и папилл. Отмечено, что ринофоры восстанавливают свою структуру после удаления, в отличие от папилл, способность к регенерации у которых отсутствует. Во время регенерации в ринофорах происходит формирование спикул *de novo*, аналогично нормальному спиккулогенезу. На основе всех полученных данных предложен наиболее вероятный путь формирования склероцитов в процессе онтогенеза и при посттравматической регенерации *O. muricata*.

На основе всех полученных данных предложен наиболее вероятный путь формирования склероцитов в процессе онтогенеза и при посттравматической регенерации *O. muricata*.

1.4 Объект и предмет исследования

Объектом исследования в данной работе послужили уникальные субэпидермальные спикулы голожаберного моллюска *O. muricata* (Nudibranchia, Mollusca). Предметом исследования является внешняя и внутренняя морфология покровов *O. muricata*, включая спикульный комплекс; особенности процессов роста, минерализации, в том числе регуляция минерализации на молекулярном уровне и преобразование химического состава спикул. Также в работе рассматриваются особенности процесса регенерации спикульных

органов на примере ринофоров и папилл и спикулогенез во время репаративной регенерации *O. muricata*.

1.5 Теоретическая и практическая значимость работы

В результате анализа полученных данных удалось сформировать представление об изменении химического состава, процессах развития и минерализации, онтогенетической динамике внешней и внутренней морфологии спикул голожаберных моллюсков. Предложена гипотеза формирования уникальных внутриклеточных субэпидермальных кальциевых спикул: формирование начинается в Икс клетках, в составе псевдостратифицированного покровного эпителия, с последующей их миграцией в субэпидермальное пространство, где они преобразуются в нормальный склероцит. В результате изучения онтогенетической динамики спикул удалось предложить путь созревания спикул и преобразования мягких органических структур в твердые кальцитовые. Сравнительно-морфологический анализ полученных данных с данными для других моллюсков может ответить на вопросы о гомологии субэпидермальных внутриклеточных спикул и эволюционном происхождении этих кальциевых структур в том числе в близких группах брюхоногих безраковинных моллюсков (*Asochlidiomorpha*, *Rhodopemorpha*).

Полученные данные по строению и формированию уникальных внутриклеточных кальцитовых спикул для представителя голожаберных моллюсков *O. muricata*, являются важным вкладом в изучение разнообразия механизмов биоминерализации, определяют принципиально новый путь формирования кальцитовых структур в живых организмах. В рамках настоящей работы выявлены различия в регенеративных возможностях ринофоров и папилл среди представителей двух групп голожаберных моллюсков (*Doridina* и *Cladobranchia*), что говорит о различных регенерационных потенциях даже внутри отрядов. Выявлена наиболее успешная модель для изучения регенерации у половозрелых особей *O. muricata*. Достоверно показана способность к спикулогенезу на поздних стадиях онтогенеза в результате посттравматической регенерации. Полученные данные позволяют расширить представление о разнообразии механизмов формирования и возобновления биоминеральных структур у беспозвоночных. Материалы данной работы могут войти в курс лекций и учебные пособия в разделы по общей и частной зоологии, а также в основу методологических пособий по изучению биоминерализации, в том числе с применением молекулярных методов исследований. Полученные результаты могут найти практическое применение в разделах биологии развития, материаловедения, медицины, биотехнологии.

1.6 Методология и методы исследования

В данной работе применялись два основных методологических подхода – сравнительно-морфологический и экспериментальный.

Исследования морфологии проводились классическими методами световой и электронной микроскопии (сканирующей и трансмиссионной), компьютерной микротомографии. Также в работе были использованы гистологические методы, методы иммуногистохимии с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа и методы трехмерной реконструкции. Химический состав спикул был изучен с помощью биофизических методов – Рамановской и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Процессы минерализации спикул были изучены с помощью молекулярных методов *in situ* гибридизации, а также в экспериментах по выявлению зон отложения кальция. Эксперименты в настоящей работе также были проведены для изучения процесса регенерации спикульных органов.

Совокупность примененных методологий и методов позволила выявить основные стадии преобразования покровов *O. muricata* на разных стадиях онтогенеза, формирования и развития спикул. Экспериментальные методы изучения минерализации спикул, а также регенерации существенно дополнили представления о спикүлогенезе. Совокупность полученных данных легла в основу сравнительно-морфологического анализа.

1.7 Положения, выносимые на защиту

- 1) Внутриклеточные субэпидермальные спикулы голожаберных моллюсков имеют эктодермальное происхождение, подобно другим внеклеточным скелетным структурам трохофорных животных.
- 2) Механизм регуляции минерализации уникальных внутриклеточных спикул сходен с минерализацией внеклеточных скелетных структур других животных.
- 3) Спикулы формируются *de novo* в процессе регенерации, повторяя путь формирования в нормальном развитии.

1.8 Личный вклад автора

Автор диссертации совместно с научным руководителем разработал предварительный план и методологию исследования, уточнял и модифицировал их на всех

этапах работы. Автор самостоятельно провёл полный литературный обзор по теме диссертации. Сбор живого материала был осуществлен лично автором и сотрудниками водолазной службы ББС МГУ им. Н.А. Перцова. Автор самостоятельно осуществлял обработку и фиксацию всего материала. Все экспериментальные работы проведены и спланированы автором самостоятельно. Все использованные в работе данные были получены автором лично. Автор лично подготовил фотографии, рисунки, схемы и трёхмерные модели. Все имеющиеся в данной работе таблицы сделаны автором самостоятельно. Текст диссертации полностью написан автором с учётом замечаний со стороны научного руководителя, а также рецензентов статей, напечатанных по теме диссертации в различных журналах.

1.9 Степень достоверности и апробация результатов

Согласованные результаты, полученные с использованием различных общепринятых методов, обеспечивают высокую степень достоверности данных. В работе использованы протоколы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях. Дизайн экспериментов соответствует современным правилам проведения исследования. Достоверность подтверждается достаточным количеством наблюдений в необходимом количестве повторностей с применением контролей.

Результаты работы были представлены на 17 конференциях, из которых 11 – международные и 6 – всероссийские. По теме диссертации опубликованы 6 работ в международных рецензируемых научных изданиях.

Список публикаций по теме диссертации:

Статьи из списка WoS и Scopus:

1. **Никитенко Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Спикульный комплекс трех видов голожаберных моллюсков семейства Onchidorididae (Gastropoda: Doridina) Белого моря // *Invertebrate Zoology*. – 2020. – Т. 17, No. 1. – С. 44–58. 1,7 п.л./ 1,5 п.л. SJR 0,569.
2. **Nikitenko E.D.**, Ereskovsky A.V., Vortsepneva E.V. Ontogenetic dynamics of the subepidermal spicule complex in Nudibranchia (Gastropoda): the case of *Onchidoris muricata* // *Zoology*. – 2021. – Vol. 144, No. 1. – P. 1-24. 1,6 п.л./ 1,4 п.л. JSR 1,6.
3. **Lisova E.D.**, Vortsepneva E.V. New data on nudibranchs rhinophore morphology and their spicule complex in *Onchidoris muricata* (Doridina, Gastropoda) // *Zoologischer Anzeiger*. – 2022. – Vol. 296, No. 1. – P. 58–70. 1,5 п.л./ 1,3 п.л. JSR 1,2.

4. Ekimova I.A., **Nikitenko E.D.**, Stanovova M.V., Schepetov D.M., Antokhina T.I., Malaquias M.A., Valdes Á. Unity in diversity: morphological and genetic variability, integrative systematics, and phylogeography of the widespread nudibranch mollusc *Onchidoris muricata* // Systematics and Biodiversity. – 2023. – Vol. 21, No. 1. – P. 1-26. 3,1 п.л./ 1,3 п.л. JSR 1,8.
5. **Nikitenko E.D.**, Vortsepneva E.V. Ontogenetic dynamics of the nudibranch epithelium in *Onchidoris muricata* (O.F. Müller, 1776) // Zoology. – 2023. – Vol.161. – P. 1-20. 2,3 п.л./ 2,0. JSR 1,6.
6. **Nikitenko E.D.**, Anisenko A.N., Vortsepneva E.V. Regeneration in the dorids exemplified by *Onchidoris muricata* (Gastropoda, Nudibranchia) // Ruthenica, Russian Malacological Journal. – 2024. – Vol. 34, No. 1. – P. 15-34. 2,3 п.л./ 2,0 п.л. SJR 0,27.

Список конференций:

1. **Никитенко Е.Д.**, Борисенко И.Е., Кремнев С.В., Ворцепнева Е.В. Новые данные о спиккулогенезе голожаберных моллюсков на примере *Onchidoris muricata* Белого моря. Всероссийская научная конференция с международным участием, посвященная 85-летию Беломорской биостанции им. Н.А. Перцова Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Беломорская биологическая станция МГУ им. М.В. Ломоносова, пос. Приморский, Лоухский район, Республика Карелия, Russia, 15-18 сентября 2023 (Стендовый доклад).
2. **Лисова Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Модели для изучения спиккулогенеза Doridina на примере *Onchidoris muricata* (O.F. Müller, 1776). XIV Всероссийская конференция с международным участием "Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря", Санкт-Петербург, Россия, 4-7 октября 2022 (Устный доклад).
3. **Лисова Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Регенерация голожаберных моллюсков на примере *Onchidoris muricata* (Doridina). Беломорская студенческая научная сессия СПбГУ — 2022, Санкт-Петербург, Россия, 2 февраля 2022 (Устный доклад)
4. **Лисова Е.Д.**, Екимова И.А., Становова М.В. морфологическая и генетическая изменчивость разных популяций амфибореальных голожаберных видов *Onchidoris muricata* (Gastropoda: Heterobranchia). X Международная научно-практическая конференция «Морские исследования и образование. MARESEDU-2021», г. Москва, Институт океанологии им. П. П. Ширшова РАН (on-line), Россия, 25-29 октября 2021. (Стендовый доклад).
5. **Лисова Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Новые данные о морфологии ринофоров Nudibranchia на примере *Onchidoris muricata* (Doridina). X Международная научно-практическая

- конференция «Морские исследования и образование. MARESEDU-2021», г. Москва, Институт океанологии им. П. П. Ширшова РАН (on-line), Россия, 25-29 октября 2021 (Устный доклад).
6. **Лисова Е.Д.**, Екимова И.А., Становова М.В. Morphological and genetic variability within different populations of amphiboreal nudibranch species *Onchidoris muricata*. Euromal 2021: 9th European Congress of Malacological Societies, Prague, Czech Republic, 5-9 сентября 2021 (Стендовый доклад).
 7. **Лисова Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. New data of Nudibranchia rhizophore morphology case of *Onchidoris muricata* (Doridina). Euromal 2021: 9th European Congress of Malacological Societies, Prague, Czech Republic, 5-9 сентября 2021 (Стендовый доклад).
 8. **Никитенко Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Общая морфология ринофоров *Onchidoris muricata* (O.F. Muller, 1776) (Doridina, Nudibranchia). XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2021", МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 12-23 апреля 2021. (Устный доклад).
 9. **Никитенко Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Особенности ультратонкого строения спикул *Onchidoris muricata* (O.F. Muller, 1776) (Nudibranchia, Mollusca) в онтогенезе. VIII Международная научно-практическая конференция «Морские исследования и образование» MARESEDU-2019, Москва, Россия, 28-31 октября 2019. (Стендовый доклад).
 10. **Никитенко Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Morphology of Onchidoridae's (Mollusca, Nudibranchia, Doridoidei) spicules networks. International Seminar on Biodiversity and Evolution of Mollusks, Владивосток, Россия, 26-27 сентября 2019. (Стендовый доклад).
 11. **Никитенко Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Спикульный аппарат голожаберных моллюсков семейства Onchidoridae (Mollusca, Nudibranchia, Doridacea). 3-я Студенческая Научная сессия УНБ «Беломорская», Санкт-Петербургский государственный университет, Россия, 8 февраля 2019 (Стендовый доклад).
 12. **Никитенко Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Спикульный аппарат голожаберных моллюсков на примере представителей семейства Onchidoridae (Mollusca, Nudibranchia, Doridacea). Юбилейная конференция в честь 160-летия кафедры зоологии беспозвоночных «Зоология беспозвоночных – новый век», Москва, Россия, 19-21 декабря 2018 (Стендовый доклад).
 13. **Никитенко Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Спикульный аппарат Onchidoridae (Mollusca, Nudibranchia, Doridacea). VII Международная научно-практическая конференция

- «Морские исследования и образование» MARESEDU-2018, МГУ, Институт океанологии РАН, Россия, 19-22 ноября 2018 (Стендовый доклад).
14. **Никитенко Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Spicules networks of the dorid mollusks (Gastropoda, Nudibranchia). VII Международная научно-практическая конференция «Морские исследования и образование» MARESEDU-2018, МГУ, Институт океанологии РАН, Россия, 19-22 ноября 2018 (Стендовый доклад).
 15. **Никитенко Е.Д.**, Ворцепнева Е.В. Общая морфология и ультратонкое строение спикул *Onchidoris muricata* (Muller, 1776) (Mollusca, Nudibranchia). Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018», МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 10-11 апреля 2018 (Устный доклад).
 16. **Никитенко Е.Д.** Общая морфология и ультратонкое строение спикул *Onchidoris muricata* (Müller, 1776) (Mollusca, Nudibranchia). 2-я Студенческая Научная сессия УНБ «Беломорская», Санкт-Петербург, Россия, 9 февраля 2018 (Стендовый доклад).
 17. **Никитенко Е.Д.** Морфологическое разнообразие спикул голожаберных моллюсков (Nudibranchia, Gastropoda) как инструмент построения филогенетической системы группы. Ломоносовские чтения - 2017, МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 17-26 апреля 2017 (Устный доклад).

1.10 Структура и объем работы

Текст работы изложен на 182 страницах и состоит из глав «Введение», включая обзор литературы, «Материал и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», так же список литературы и приложения. Список литературы включает 160 источников, из которых 3 – русскоязычные, а 157 – на иностранном языке. Приложения представлены 7 таблицами, иллюстративным материалом (всего 75 изображений) и протоколами пробоподготовок и фиксаций.

1.11 Благодарности

Выражаю особую благодарность своему научному руководителю — д.б.н. Е.В. Ворцепневой за неоценимую помощь и поддержку на протяжении всего научного

пути. Автор искренне благодарен И.А. Косевичу за многократное обсуждение работы, ценные правки и рекомендации по улучшению работы.

Автор выражает благодарность:

- А.Б. Цетлину, А.В. Ересковскому, А.В. Чесунову, А.И. Лаврову, Е.Н. Темеревой, И.А. Екимовой, Б.В. Осадченко, Ф.В. Большакову, Н.М. Бисеровой, А.Л. Михлиной за советы и плодотворное обсуждение работы;
- И.Е. Борисенко, С.В. Кремнёву, В.В. Козину, Т.С. Лебедевой, А.А. Ветровой, А.В. Безменовой за неоценимую помощь в освоении молекулярных методов исследований, включая гибридизацию *in situ*;
- А.А. Семёнову, Д.А. Озерову, А.И. Чаве, Г.Д. Захарову, А.Л. Михлиной, Г.Д. Колбасовой, М.А. Петровой, Т.А. Антохиной, А.Д. Плаксину и всему коллективу водолазной службы ББС МГУ за помощь в сборе материала;
- Л.Ю. Крючковой, Д.В. Коросту, М.Р. Вигасиной, И. Крупатину, А.А. Пирязеву за помощь в исследованиях методами компьютерной микротомографии, Рамановской спектроскопии, энерго-дисперсионной рентгеновской спектроскопии;
- всему коллективу кафедры ЗБП МГУ, ББС МГУ им. Н.А. Перцова, МЛЭМ МГУ, ЦКП Института внутренних вод им. И.Д. Папанина, ЦКП «Хромас» СПбГУ;

Работа выполнена при поддержке грантов: РФФ: № 21-14-00042, № 4-24-00028, № 20-74-10012; РФФИ — 18-34-00251мол_а.

1.12 Обзор литературы

Спикулы – широко распространенные минеральные скелетные элементы, встречающиеся среди одноклеточных и многоклеточных, как беспозвоночных, так и позвоночных животных (Рис. 1.1, Таблица1.1). Спикулы характерны для некоторых интерстициальных инфузорий, губок и стрекающих, а также первичноротых – плоских червей, моллюсков, немертин, и вторичноротых – иглокожих и асцидий (Graham 1957; Dragesco, 1960; Jones, Jenkins, 1969; Carter, Aller, 1975; Lambert, Lambert, 1996; Salvini-Plawen, 1967; Rieger, Sterrer, 1975; Emlet, 1982; Leise, 1984; Sandford, 2003; Rahman, Oomori, 2008; Le Roy et al., 2021).

Морфология спикул бывает крайне разнообразна (Рис. 1.2) (Rieger, Sterrer, 1975; Lambert, 1992; Grillo et al., 1993; Uriz et al., 2003; Killian, Wilt, 2008; Eder et al., 2011; Wilson et al., 2017; Ehrlich, 2019; Łukowiak, 2020; Wendt et al., 2023). Во многих перечисленных группах беспозвоночных спикулы представлены вытянутыми иглоподобными структурами,

нередко разветвленными, также встречаются и другие формы спикул, однако их классификация не так однозначна. Детали тонкой морфологии спикул, их синтеза, способа формирования, процесса минерализации сильно различаются даже в пределах одной систематической группы животных, а для многих беспозвоночных такие данные вовсе остаются не известными (Woodland, 1907; Okazaki, 1975; Ledger, Jones, 1977; Kingsley, 1984; Lambert, Lambert, 1987; Gilbert, Wilt, 2011; Wang et al., 2011; Voigt et al., 2017; Le Roy et al., 2021; Wendt et al., 2023; Shimizu et al., 2024).

1.12.1 Разнообразие спикул беспозвоночных

Спикулы можно классифицировать по нескольким признакам: 1) химическому составу; 2) форме; 3) функциям; 4) способу формирования и происхождению в эмбриогенезе; 5) локализации в теле.

Химический состав. По химическому составу спикулы можно разделить на кремнеземные и кальциевые (Рис. 1.1). Кремнеземные спикулы встречаются только среди стеклянных губок (*Demospongia*, *Hexactinellida*, *Homoscleromorpha*) и состоят из стеклоаморфного кремнезема ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), подобного опалу или силикагелю (Sanford, 2003; Croce et al., 2004; Carballo, Cruz-Barraza, 2010). Кальциевые спикулы получили более широкое распространение и встречаются в остальных группах беспозвоночных. В составе спикул карбонат кальция (CaCO_3) встречается в нескольких модификациях – в виде кальцита (*Ciliophora*, *Calcarea*, *Alcyonacea*, *Platyhelminthes*, *Nemertea*, *Echinodermata*), арагонита (*Scleractinia*, *Bivalvia*, *Aplousobranchia*, *Polyplacophora*, *Gastropoda*), ватерита (*Nudibranchia*), также в составе спикул отмечены примеси магния, железа, алюминия и серы (*Calcarea*, *Scleractinia*, *Nudibranchia*, *Echinodermata*) или аморфного карбоната кальция (*Echinodermata*, *Ascidacea*) (Odum, 1951; Lowenstam, Weiner, 1983; Grillo et al., 1993; Cattaneo-Vietti et al., 1995; Hasse et al., 2000; Arnold et al., 2001; Weiner et al., 2003; Jacob et al., 2008; Mironov, 2008; Rahman, Oomori, 2008; Schwabe, Tsiamis, 2017). Данные модификации карбоната кальция отличаются кристаллической решеткой и физическими свойствами (Parker, 1983). Однако стоит отметить, что для многих групп животных точные модификации карбоната кальция не установлены, либо данные требуют верификации современными методами.

Форма. Форма спикул бывает крайне разнообразной (Рис. 1.2). Спикулы могут быть в виде острых или тупых иголок, в том числе разветвленных (у губок, моллюсков, плоских червей), шариков или колесиков (губки, иглокожие, некоторые моллюски), в виде копы (у

моллюсков), различных пластинок (иглокожие). Форма спикул нередко используется как систематический признак. Среди губок, некоторых моллюсков (например, Acochlidimorpha), некоторых иглокожих (например, голотурий) морфология спикул является одним из основных видоспецифичных признаков (Rieger, Sterrer, 1975; Uriz et al., 2003; Penney, 2008; Łukowiak, 2020). Несмотря на многообразие спикул, классифицированы только спикулы иглоподобной формы. Такие спикулы имеют главную (самую длинную) ось и более короткие выросты, отходящие от нее. Их номенклатура заимствована из классификации спикул губок, но применима и к другим беспозвоночным (Łukowiak et al., 2022). Выделяют одноосные, двуосные, трехосные и четырехосные спикулы.

Функции. В литературе описаны несколько функций спикул (Rieger, Sterrer, 1975; Kress, 1981; Potts, 1981; Foale, Willian, 1987; Lowenstam, Weiner, 1989; Uriz et al., 2003; Penney, 2006; Goodheart, Bely, 2017). Спикулам приписывают 1) опорную (поддерживающую) функцию у кораллов, плоских червей, иглокожих; 2) защитную, как от хищников, так и механическую от истирания тела для многих беспозвоночных; 3) функцию увеличения удельного веса (для интерстициальных животных); 4) функцию заякоревания при передвижении (для удлинённых спикул Chaetodermatida (Mollusca) при перистальтическом движении в толще осадка или интерстициальных Acochlidimorpha (Mollusca)); 5) сенсорную функцию, связанную с передачей тактильных сигналов (для интерстициальных животных) (Rieger, Sterrer, 1975).

Формирование и локализация. Спикулы могут быть расположены внутри- или внеклеточно, снаружи от эпителия или под ним – в субэпидермальном пространстве. В настоящее время довольно подробно описано формирование спикул губок, кораллов, иглокожих, аплакофор и полиплакофор (Рис. 1.3) (Woodland, 1907; Carter, Aller, 1975; Ledger, Jones, 1977; Kingsley, 1984; Matranga et al, 2011; Stumpp et al, 2012; Voigt et al, 2017).

На данный момент известно, что спикулы кремневых губок и стрекающих формируются внутриклеточно в склероцитах (Grillo et al., 1993; Müller et al., 2005). Однако на терминальной стадии формирования спикула выходит во внеклеточное пространство из клетки, которая в свою очередь разрушается (Рис. 1.3А). У известковых губок спикулы формируются несколькими специализированными клетками – склероцитами, сразу во внеклеточном пространстве. У моллюсков в группах Bivalvia, Caudofoveata, Solenogastres, Polyplacophora спикулы также формируются внеклеточно одной или несколькими эктодермальными клетками покровного эпителия (Рис. 1.3Б, В, Г) (Ledger, Jones 1977; Carter, Aller, 1975; Ehrlich, 2010; 2019). В группах Echinodermata, Ascidiacea спикулы формируются внеклеточно в синцитиальном пространстве, образованным мезодермальными клетками (Рис. 1.3Д) (Woodland, 1907; Lambert, Lambert, 1987; Lambert,

1992; Beniash et al., 1999). Способ формирования спикул инфузорий, плоских червей, немертин, брюхоногих моллюсков (*Nudibranchia*, *Acochliidiidae*, *Rhodopoidea*) до сих пор не изучен. Однако известно, что у взрослых особей плоских червей и немертин спикулы расположены внеклеточно в покровах, а у брюхоногих моллюсков – внутриклеточно под покровным эпителием (Rieger, Sterrer, 1975; Morse, 1976; Haszprunar, Künz, 1996; Mikhlina et al., 2024).

Вышеописанная классификация спикул позволяет сформировать представление о широком разнообразии и вариациях этих структур в разных группах беспозвоночных. В процессе эволюции спикулы происходили независимо несколько раз (Voigt et al., 2014). Несмотря на это, принципы их формирования и минерализации остаются сходными во всех группах животных.

В основе спикул вне зависимости от их происхождения в эмбриогенезе находится органическая матрица, которая со временем минерализуется и превращается в биокompозитный материал. Процесс минерализации органической матрицы является ключевым в формировании твердых спикул.

Органическая матрица. В настоящее время известно, что органическая матрица формируется белками, подверженными посттрансляционной модификации (гликозилированию и/или фосфорилированию), нередко связанными с такими компонентами как хитин и коллаген (Müller et al., 2005; Le Roy et al., 2021). Белки, составляющие основу спикул, специфичны для разных групп животных. Для трех классов губок (*Hexactinellida*, *Demospongiae* и *Homoscleromorpha*) известны спикулообразующие белки гексаксиллин, глассин и силикатин, соответственно. Подобное различие в белковом составе органической матрицы свидетельствует в пользу различной гомологии спикул (Müller et al., 2005; Shimizu et al., 2024). В основе спикул шестилучевых кораллов лежит специфичный белок склеритин, в то время как у восьмилучевых кораллов – коллаген-, аргин- и галаксин подобные белки (Rahman, Oomori, 2008; Le Roy et al., 2021). Для иглокожих идентифицировано несколько десятков белков, формирующих органическую матрицу спикул, причем все белки содержат лектиновые домены С-типа, которые также обнаружены в минерализованных тканях и структурах других беспозвоночных и позвоночных животных (Mann et al., 2010; Flores, Livingston, 2017). Белковый состав спикул других беспозвоночных в настоящее время остается не расшифрован несмотря на то, что именно пространственная организация и химический состав матрикса являются ключевыми параметрами, определяющими структуру скелета и особенности процесса биоминерализации (Le Roy et al., 2021).

Регуляция минерализации. Минерализация белковых матриц – многостадийный процесс, требующий сложной регуляции. Наиболее подробно этот процесс изучен для губок и морских ежей, в том числе на молекулярном уровне. В настоящее время идентифицированы некоторые из регуляторных белков в разных группах беспозвоночных (Таблица 1.1) (Uriz et al. 2000, 2003; Müller et al., 2005; Wilt et al., 2013; Koga et al., 2014; Voigt et al., 2017, 2019; Murdock, 2020).

Для некоторых кремниевых губок известен фермент, катализирующий синтез кремниевого материала спикул и их осевых нитей – силикатеин (Shimizu et al. 1998; Voigt et al., 2017). Причем показано, что силикатеин также находится не только в составе матрикса спикул, но и снаружи от них в виде пропептида (Müller et al., 2005). Пропептид подвергается ступенчатому фосфорилированию, в результате чего приобретает ферментативную активность и влияет на осаждение кремния на матрицу.

Биоминерализация карбоната кальция наиболее распространена среди разных типов живых организмов, развивалась несколько раз независимо, что приводило к многократному привлечению одних и тех же генов для биоинерализации в разных линиях животных (Voigt et al., 2017; Murdock, 2020). Например, среди многоклеточных животных наблюдается функциональная конвергенция, связанная с участием карбоангидраз в минерализации (Le Roy et al., 2014, 2021).

Карбоангидразы (КА) – белки из большого семейства металлоферментов, которые катализируют обратимую гидратацию углекислого газа (Voigt et al., 2021). Белки семейства α -КА являются ключевыми ферментами, участвующими не только в биокальцификации (кальцификации и декальцинации), но и в широком спектре физиологических функций, включая регуляцию pH, транспорт углекислого газа, цикл мочевины, глюконеогенез, синтез жирных кислот и аминокислот, а также фотосинтез (Le Roy et al., 2014). В некоторых группах многоклеточных животных α -КА описаны как ферменты, растворяющие кальций, например, в костях позвоночных животных и спикулах известковых губок (*Sycon raphanus* Schmidt, 1862). Недавно было обнаружено, что КА у мышей синтезируются амелобластами и участвуют в биоинерализации во время развития зубов. Изоформы α -КА кораллов взаимодействуют в углеродном цикле эндосимбиотических зооксантелл, играя опосредованную роль в формировании скелета (Le Roy et al., 2014). Несмотря на многочисленные данные о функциях карбоангидраз в целом, данные о разнообразии белков этого семейства и их функциях среди беспозвоночных ограничены лишь модельными (например, *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson, 1857)) или коммерчески ценными видами (например, представители рода *Pinctada* Röding, 1798, *Lottia gigantea* Sowerby, 1834 и др.) (Voigt et al., 2021).

Карбоангидразы в клетке могут занимать различное положение – цитозольное, мембрано-ассоциированное, митохондриальное и в секреторных везикулах (Le Roy et al., 2014). Расположение α -КА связано с их функцией; например, у моллюсков большинство известных α -КА участвуют в формировании раковины и располагаются внеклеточно. В процессе минерализации α -КА выполняют две функции: 1) взаимодействуют с отрицательно заряженными ионами бикарбоната вблизи места зародышеобразования минерала и 2) взаимодействуют с кислыми доменами белков матрикса, которые участвуют во соединении с ионами кальция (Le Roy et al., 2014).

1.12.2 Регенерация кальцитовых структур у беспозвоночных

В настоящее время изучена регенерация спикул у известковых губок и иглокожих (Dubois, Ameys, 2001; Politi et al., 2004; Lavrov et al., 2018). При регенерации губок происходит синтез новых спикул в регенеративной мембране, что можно наблюдать уже на 72-96 час после повреждения. Причем формирование спикул разной формы разнесено по времени. Первоначально появляются трехосные и четырехосные спикулы, а синтез двусосных начинается позже, на 96-120 час после повреждения (Lavrov et al., 2018).

На примере иглокожих показано, что во время регенерации происходит повторение эмбрионального пути развития спикул. В процессе эмбриогенеза спикулы состоят из аморфного карбоната кальция, который и откладывается заново при регенерации (Politi, 2004). Процесс регенерации начинается с заживления раны, во время чего эпителий восстанавливается вокруг поврежденной спикулы. Затем вновь формируется синцитий, который контактирует с поломанной спикулой. Новый кристалл начинает зарождаться эпитаксиально на поврежденном участке спикулы. Регенерированные фрагменты изначально представлены тонким слоем аморфного карбоната кальция, который со временем трансформируется в кристаллический кальцит, минерализация при этом происходит внеклеточно. Рост спикул продолжается до тех пор, пока не будет восстановлена их первоначальная длина (Dubois, Ameys, 2001).

В настоящее время данные по регенерации спикул моллюсков отсутствуют. Однако некоторые авторы проводят гомологию между раковинной и спикулами брюхоногих моллюсков, в связи с этим, кратко будет рассмотрен принцип строения раковины и ее регенерация (Ros, 1976). Впервые рост раковины моллюсков был изучен более 300 лет назад (Reamur, 1709). Именно тогда было выдвинуто предположение о том, что раковина секретируется мантией. Спустя столетие Фреми (Fremy, 1855) отметил, что в составе

раковины присутствует два компонента – неорганический и органический, который был назван «конхиолиновым». История изучения строения раковины, а также роль мантии в ее синтезе подробно описана в работе Тиммерманса (Timmermans, 1969). В состав раковины входит три слоя – наружный органический (конхиолиновый); средний (призматический или фарфоровидный), содержащий известковые элементы и внутренний (перламутровый). Такие представления о строении раковины моллюсков надолго закрепились в литературе, однако у большинства гастропод раковина устроена сложнее, в составе раковины обнаружено пять слоев (*Lottia kogamogai* (Sasaki, Okutani, 1994), Patellogastropoda) (Kocot et al., 2017). Самый внешний слой в основном состоит из кальцита с мозаичной организацией, тогда как остальные слои состоят из призматически расположенных кристаллов арагонита (Suzuki et al., 2010; Marie et al., 2009). Различные слои раковины секретируются клетками мантийного эпителия, однако, единого мнения о роли мантии в этом процессе долгое время не было (Timmermans, 1969; Furuhashi et al., 2009). Сейчас известно, что периострацин синтезируется в мантийной борозде и становится нерастворимым во внеклеточном пространстве, ограничивая периостракальную полость. Органическая матрица для формирования раковины синтезируется клетками мантии в периостракальную полость (Abolins-Krogis, 1958; Timmermans, 1969; Watabe, 1983).

Регенерация раковины моллюсков была изучена более чем на 20 видах, причем как для наземных, так и водных (Saleuddin, Wilbur 1969; Timmermans, 1969; Meenakshi et al., 1973; Beedham, 1958; Su et al., 2004). Несмотря на сложность процесса синтеза раковины, при ее повреждении моллюски способны к ее полному восстановлению. Отмечено, что регенеративная способность не зависит от пола моллюска, возраста, размера, а также степени зараженности паразитами (Короткова, 1997; Gorbushin et al., 2001; Tartakovskaia et al., 2003). Процесс регенерации раковины отличается от ее нормального формирования в онтогенезе, а особенности морфологии восстановленной раковины зависят от области и степени повреждения (Abolins-Krogis, 1958; Watabe, 1983; Сидельников, 1991; Gorbushin et al., 2001).

При повреждении раковины наблюдается следующая последовательность восстановления: спустя 1-2 часа в месте повреждения мантии начинает формироваться прозрачная белковая оболочка (Abolins-Krogis, 1958; Timmermans, 1969; Watabe, 1983). Под белковой оболочкой происходит восстановление мантийного эпителия за счет эпителиальных клеток, мигрирующих от края раны к ее центру. Восстановленный мантийный эпителий секретирует органический (конхиолиновый) слой раковины. Восстановление раковины может сопровождаться изменением в составе органических элементов, выделяемых мантией, что влияет на скорость регенерации. Далее начинается

укрепление только что сформированного органического слоя путем кальцификации, что происходит спустя сутки после повреждения (Abolins-Krogis, 1958). В белковой и пищеварительной железе в норме существует депо кальция, именно оттуда амебоциты транспортируют кальций к месту повреждения. После этого начинается рост кристаллов карбоната кальция. Отмечено, что в периферической части повреждения рост идет быстрее, чем в центральной, однако, причина такого различия неясна (Wagge, Mittler, 1953).

Отмечено, что восстановление раковины у моллюсков, обитающих в море, происходит гораздо дольше, нежели у пресноводных или наземных представителей. Это связано с тем, что повреждение раковины у наземных моллюсков, в отличие от водных, может привести к нарушению газообмена из-за высыхания (Watabe, 1983).

1.12.3 Разнообразие спикул у Mollusca

Среди моллюсков спикулы встречаются у представителей самых разных эволюционных групп – как Conchifera (Bivalvia, некоторых Gastropoda, в том числе у вторично безраковинных), так и Aculifera (Polyplacophora, Aplacophora) (Graham, 1957; Salvini-Plawen, 1967, 1972; Carter, Aller, 1975; Leise, 1984; Scheltema, 1993; Treves et al., 2003; Brenzinger et al., 2013). Спикулы моллюсков во многом отличаются от спикул других беспозвоночных, поскольку, как уже было упомянуто, спикулы большинства моллюсков располагаются внеклеточно на поверхности покровного эпителия.

У представителей брюхоногих моллюсков из подкласса Heterobranchia встречаются спикулы, которые занимают не типичное для моллюсков субэпидермальное положение и больше напоминают спикулы губок и вторичноротых беспозвоночных животных (Ehrlich, 2010; 2019). Уникальной особенностью является и внутриклеточное положение спикул (Foale, Willan, 1987; Haszprunar, Künz, 1996; Mikhlina et al., 2024), что встречается лишь на ранних стадиях формирования спикул у представителей других групп беспозвоночных (некоторые кораллы), после чего спикулы всегда располагаются внеклеточно (Morse, 1976; Leise, 1984; Scheltema, 1993; Kocot et al., 2017).

Субэпидермальные внутриклеточные спикулы. Субэпидермальные внутриклеточные спикулы известны лишь в трех группах безраковинных брюхоногих моллюсков Heterobranchia – Acochlidiiomorpha, Rhodopemorpha и Nudibranchia.

Acochlidiiomorpha. Это небольшая группа Heterobranchia, в которой к настоящему времени описано всего 47 видов (Mikhlina et al., 2024). Тело акокхлидиид обычно состоит из головы, ноги и висцерального горба. В теле почти всех видов (кроме *Microhedyle remanei*

(Er. Marcus, 1953) и *Paraganitus ellynae* (Challis, 1968)) имеются твердые спикулы. Известно, что спикулы ахохлидид, подобно спикулам голожаберных моллюсков, находятся под покровным эпителием (Rieger, Sterrer, 1975; Jörger et al., 2008; Neusser et al., 2009). Данные о спикулах ахохлидид в основном ограничены внешней морфологией и расположением в теле, так как эти признаки используются при таксономическом описании (Schrödl, Neusser, 2010). Однако недавнее исследование ультраструктуры стенки тела *Asperspina turmanica* (Kudinskaya, Minichev, 1978) показали, что спикулы образуют плотный слой в субэпидермальном пространстве под слоем мышц, а между ними расположено небольшое количество коллагеновых волокон (Mikhlina et al., 2024). Спикулы лежат в вакуолях специализированных клеток – склероцитах. Причем в некоторых из вакуолей склероцитов после декальцинации детектирован внутриклеточный органический матрикс. Однако детали формирования и созревания спикул остаются не известными.

Rhodopemorpha. Это группа маленьких интерстициальных или псаммобиотических Heterobranchia, тело которых имеет червеобразную форму, без ноги (Haszprunar, 1997). О химическом составе спикул ничего не известно, однако встречаются упоминания о кальцитовой природе, не имеющие подтверждения (Wilson et al., 2017). Для нескольких видов описана форма и размер спикул. Спикулы расположены в волокнистой соединительной ткани непосредственно под эпидермисом, также как у Acochliidiomorpha, внутриклеточно. Для спикул *Rhodope* прослежено, что первые спикулы появляются на 16-18 день эмбрионального развития; они формируются довольно быстро и почти в окончательном размере (Riedl, 1960). Однако тонкое строение склероцитов, природа предшественников, способ формирования спикул и их минерализации все еще остаются не известны.

Nudibranchia. Это группа свободноживущих морских брюхоногих моллюсков, включающая более 3000 видов, распространенных по всему миру (Hallas et al., 2017). В состав Nudibranchia входят две группы Cladobranchia и Doridina. Субэпидермальные спикулы встречаются только в покровах большинства дорид, в то время как у кладобранхий отсутствуют. Поскольку голожаберные моллюски широко распространены и обитают в легкодоступных биотопах по сравнению с Acochliidiomorpha и Rhodopemorpha, данных о спикулах существенно больше. В литературе встречаются упоминания о наличии в составе спикул различных форм карбоната кальция, таких как кальцит (Odum, 1951; Ehrlich, 2010; 2019), ватерит, флуорит, аморфный кальцит, а также соединений магния, например, брусит (Lowenstam, Weiner, 1983; Cattaneo-Vietti et al., 1995; Weiner et al., 2003; Kasamesiri et al., 2011). В тоже время существуют данные о наличии незначительного количества органических веществ в спикулах (Woodland, 1907). Отмечено, что соотношения кальция

и флуорита может зависеть от состояния внутренней среды моллюска, а именно уровня кислотности в конкретных участках тела (Cattaneo-Vietti et al., 1995).

Особенности локализации спикул в теле Nudibranchia. Подобно другим Heterobranchia, спикулы дорид располагаются под покровным эпителием. Однако время появления спикул в покровах остается не известным. Покровы голожаберных моллюсков существенно преобразуются в онтогенезе, поскольку развитие голожаберных моллюсков происходит с личиночной стадией велигера (Thompson, 1961; Chia, Koss, 1982; Bickell, Chia, 1979; Goddard, 2005). Тело велигера защищено раковиной, которая отбрасывается во время метаморфоза (Thompson, 1961; Chia, Koss, 1982; Goddard, 2005). Потеря раковины, вероятно, является сигналом к началу трансформации стенки тела ювенили. Покровы играют важную роль в выживании у многоклеточных животных, отделяя и защищая их от внешней среды. Функции покровов крайне разнообразны: защита от травм и инфекций, участие в регуляции температуры тела и водного баланса, дыхательной активности, мониторинга окружающей среды и передача сигналов (Bereiter-Hahn et al., 2012). Покровы голожаберных моллюсков находятся в непосредственном контакте с внешней средой на всех постличиночных стадиях развития.

В настоящее время покровный эпителий у взрослых голожаберных моллюсков описан лишь частично для нескольких видов дорид (Skidmore, Rivera, 1982; Thompson, 1983; Wägele, 1998). Морфология ресничных эпителиальных клеток довольно универсальна (Bereiter-Hahn et al., 2012). Ядро этих клеток смещено базально, а апикальная часть клеток соединена адгезивными и септированными контактами. Эпителий нотума (тела) состоит в основном из кубических и столбчатых эпителиальных клеток, большинство из которых содержат характерную крупную вакуоль. Такие вакуоли содержат кислый секрет (Edmunds, 1968; Wägele, Cervera, 2001). Эпителий ноги в отличии от эпителия нотума состоит из высоких столбчатых клеток (Skidmore, Rivera, 1982).

Эпителий дорид несет большое количество железистых клеток, однако классификация этих клеток затруднительна. Секрет железистых клеток выполняет множество функций – защитную, локомоторную и даже пищеварительную (Davies, Hawkins, 1998). Упоминания о строении раннего ювенильного эпителия в настоящее время встречаются только для *Adalaria proxima* (Alder, Hancock, 1854) (Thompson, 1961; Schmekel, Wechsler, 1967). Показано, что между собой ювенильные эпителиальные клетки соединены десмосомами, однако между ними имеются очень большие межклеточные пространства (Schmekel, Wechsler, 1967). Несмотря на многочисленные данные о структуре эпителия, его реорганизация в онтогенезе никогда не изучалась.

Под покровным эпителием голожаберных моллюсков располагаются мышечные элементы, отростки фибробластов, а также спикулы (у дорид), окруженные коллагеновым матриксом (Haszprunar, Künz, 1996).

В настоящее время известно, что положение спикул в теле голожаберных моллюсков зависит от функции и степени подвижности участка тела, в котором они локализованы. Наличие спикул влияет на жесткость покровов и на локомоцию моллюсков (Sánchez-Tocino et al., 2014). Наибольшую подвижность имеют участки тела с небольшим количеством спикул или вовсе без них (Kasamesiri, 2011; Sánchez-Tocino et al., 2014).

Спикулы в теле половозрелых особей расположены не хаотично, а формируют упорядоченные скопления – тракты (Penney, 2008; Kasamesiri et al., 2011; Penney et al., 2020). По расположению спикул относительно фронтальной плоскости тела выделяют два основных типа трактов: горизонтальный в ноге и нотуме и вертикальный в папиллах (Рис. 1.4). Совокупность всех трактов в теле формирует спикульную сеть. Выделяют дендритную, паутинную, решетчатую, ортогональную, многослойную сети, а также сети, сформированные отдельными спикулами (Penney, 2008). Спикулы дендритной сети расположены в краевой части нотума перпендикулярно краю, выстраиваясь в древовидную структуру (например, *Cadlina luteomarginata* (MacFarland, 1966) (Рис. 1.4А, Г, Ж). Спикулы паутинной сети формируют сеть как в центральной, так и в краевой части нотума, напоминая скелет губок (например, *Diaulula sandiegensis* (Cooper, 1863) (Рис. 1.4Б, Д, З). Решетчатая сеть считается наиболее организованным типом сетей; состоит из кольцевого тракта по краю нотума, радиальных трактов, расположенных перпендикулярно краю; в центральной части тела спикульный тракт напоминает решетку (например, *Phyllidia varicosa* Lamarck, 1801) (Рис. 1.4В, Е, М). Спикулы ортогональной сети расположены перпендикулярно как друг другу, так и краю тела (например, *Phyllidiopsis cardinalis* Bergh, 1876) (Рис. 1.4К). Многослойная сеть сложена несколькими перекрывающимися слоями спикул, каждый слой расположен под углом к переднезадней оси тела (например, *Onchidoris bilamellata* (Linnaeus, 1767)) (Рис. 1.4М). Спикульная сеть может быть представлена отдельными спикулами, расположенными на расстоянии друг от друга (например, *Berthella californica* (Dall, 1900)) (Рис. 1.4И).

Внешняя морфология спикул (форма) изучена для более 20 видов голожаберных моллюсков, причем в последнее десятилетие такие данные существенно расширились в связи с применением метода компьютерной микротомографии (Moles et al., 2017; Penney et al., 2020; Urgorri et al., 2021; Ekimova et al., 2024a; 2024b). Для голожаберных моллюсков также пытались применять морфологию спикул качестве систематического признака (Penney, 2008). Однако данные оказались разрознены и неполны, что пока не позволило

применять данный признак в систематике. Несмотря на это, в настоящее время отмечены сходные спикульный состав и паттерны расположения спикул в пределах родов (Penney et al., 2020). Следовательно, изучение спикул в разных группах голожаберных моллюсков может повлиять на применение данного признака в классификации дорид в будущем.

В теле дорид встречаются одноосные, двуосные, трехосные, четырехосные спикулы и другие типы спикул (Рис. 1.5) (Kress, 1981; Chang et al., 2013; Sánchez-Tocino et al., 2014;). Одноосные спикулы могут быть представлены иглоподобными структурами с отличиями в микрорельефе и соотношению длины и диаметра: 1) прямые толстые с округленными кончиками (Рис. 1.5А); 2) тонкие прямые или слегка изогнутые с заостренными концами и неровностями (Рис. 1.5Б); 3) толстые с двумя тупыми концами, обычно большим количеством бугорков и неровностей (Рис. 1.5В); 4) изогнутые с закругленными концами, причем изгиб может быть как по центру спикулы, так и смещен к одному из краев спикулы (Рис. 1.5Г); 5) слегка изогнутые и толстые с закругленными кончиками и бугорками (Рис. 1.5Д).

Все многоосные спикулы имеют длинную центральную ось и короткую (-ие) вторичные оси. Двуосные спикулы могут быть: 1) прямыми со вторичной осью, отходящей от центра главной оси спикулы; 2) с изгибом, при этом вторичная ось немного смещена от центра (Рис. 1.5Е); 3) с изгибом и бугорками на поверхности (Рис. 1.5Е). Трехосные и четырехосные спикулы встречаются двух типов: прямые со вторичными осями в центральной части спикулы (Рис. 1.5Ж, З) и изогнутые с короткими вторичными осями в центральной части (Рис. 1.5Ж, И). Другие типы представлены сферическими гладкими спикулами, сферическими с неровностями на поверхности, Н-образными (Рис. 1.5Н), с дихотомическим разветвлением на конце (Рис. 1.5О).

Внутренняя морфология спикул известна для 13 видов дорид (Foale, Willan, 1987; Cattaneo-Vietti et al., 1995; Schrödl, 2000). Отмечена полая, концентрическая, концентрическая с монолитным центром и радиальными слоями, а также монолитная внутренняя структура спикул.

Данные по гистологическому строению спикул дорид, особенностям строения спикульных клеток до настоящего времени изучены не были.

Формирование спикул. Способ формирования спикул Heterobranchia (Gastropoda, Mollusca) все еще остается не известным. В процессе эволюции спикулы в группе разножаберных, а именно Acochliidiomorpha, Rhodopoidea и Nudibranchia, вероятнее всего произошли независимо. Возникновение внутренних спикул у Acochliidiomorpha и Rhodopoidea связывают с интерстициальным образом жизни, а у Nudibranchia – с потерей раковины (Rieger, Sterrer, 1975; Jörger et al., 2008). Известно, что раковина и спикулы других

моллюсков имеют эктодермальное происхождение. Однако и раковина, и спикулы располагаются внеклеточно, в связи с чем природа субэпидермальных спикул гетеробранхий требует уточнения.

В настоящее время существуют две гипотезы закладки спикул *Nudibranchia*, которые противоречат друг другу. Согласно первой, более распространенной – каждая спикула синтезируется в мантии одной клеткой еще на стадии велигера из сферической минеральной конкреции, с последующим погружением этой конкреции в субэпидермальное пространство (Woodland, 1907; Thompson, 1958; Rose, 1983). Согласно второй гипотезе, синтез спикул происходит спикулообразующими клетками непосредственно в субэпидермальном пространстве, однако, происхождение этих клеток, их преобразование и механизм закладки спикул не уточняются (Avila, Durfort, 1996). Процесс минерализации также остается не изучен.

Модификации спикул в онтогенезе. Преобразование спикульного комплекса было прослежено частично для *Adalaria proxima* (Alder & Hancock, 1854) и *Atagema alba* (O'Donoghue, 1927) на ранних этапах постларвального развития (Thompson, 1958; Goddard, Green, 2013) (Рис. 1.6). Известно, что первые спикулы детектируются только в центральной части дорсальной стороны нотума ювенили сразу после оседания и метаморфоза велигера (Рис. 1.6А, Б). Сначала спикулы толстые и короткие, впоследствии они становятся более вытянутыми (Рис. 1.6) (Thompson, 1958).

Стоит отметить, что большинство имеющихся данных о спикулах голожаберных моллюсков получены на доридах, размер и возраст которых не установлен. Однако, именно понимание онтогенетического преобразования морфологии тела, покровов, спикул и спикульного комплекса является ключевыми в изучении спикулогенеза во время нормального развития, а также в процессе регенерации. Именно эти недостающие данные помогут ответить на вопросы: в какой момент происходит закладка спикул, какое эмбриональное происхождение они имеют – эктодермальное, как спикулы и раковина других моллюсков, или подобно иглокожим – мезодермальное? Как спикулы оказываются в субэпидермальном пространстве, как осуществляются процессы роста и минерализации, как регулируются эти процессы, преобразуются ли спикулы в онтогенезе, как изменяется их химический состав и многие другие.

2 Материал и методы исследования

2.1 Сбор материала. Прижизненные наблюдения

Объектом исследования в данной работе был выбран голожаберный моллюск *Onchidoris muricata* (O.F. Müller, 1776) широко распространенный в северных морях (Рисунок 1.7). Выбор объекта был обусловлен легкой доступностью, удобными размерами объекта, а также хорошо развитым спиккулярным комплексом.

Сбор *O. muricata* производился в окрестностях Беломорской биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова в Кандалакшском заливе Белого моря (66°33'17"N, 33°06'02"E). Особи *O. muricata* размером от 1 до 12 мм (максимально возможных в Белом море) были собраны вручную на литорали или лёгководолазным методом. *Onchidoris muricata* размером от 100 мкм до 1 мм были собраны по методу, описанному Йоргер с соавторами (Jörger et al., 2014) с ракушки *Modiolus modiolus* (Linnaeus, 1758), что связано со спецификой местообитания ювенилей. Всего было собрано более 900 особей *O. muricata* всех размеров (Таблица 2.1).

Прижизненные наблюдения. После сбора все особи *O. muricata* были помещены в ёмкости с субстратом – камнями или водорослями и объектами питания – мшанками *Electra pilosa* (Linnaeus, 1767), *Membranipora membranacea* (Linnaeus, 1767) для дальнейшего изучения в лабораторных условиях. Температура содержания была приближена к температуре воды в естественной среде обитания. Прижизненные фотографии моллюсков были выполнены с помощью бинокюляра Leica M165C, оснащенного камерой Leica DFC420 (Leica Biosystems Division of Leica Microsystems Inc., Германия).

Подготовка перед фиксацией. Перед фиксацией и любыми манипуляциями проводили расслабление моллюсков в растворе хлорида магния ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) изотоничному морской воде (Приложение 1.1). Расслабление проходило при температуре содержания 8-10°C. Продолжительность расслабления зависела от размеров моллюсков и занимала от 1 до 12 часов.

2.2 Изучение общей морфологии спиккулярного комплекса

Компьютерная микротомография. Для изучения взаимного расположения спикул в теле половозрелых особей было зафиксировано 14 особей, часть из которых была зафиксирована 96% этиловым спиртом, другая – 2,5% глутаровым альдегидом (ГА) на

фосфатном буфере (Приложение 8.3.1; 8.3.2). При фиксации ГА далее моллюски были дегидратированы в спиртах восходящей концентрации, после чего все особи были высушены в критической точке с помощью Hitachi Critical Point Dryer HCP-2 (Hitachi, Япония) (Приложение 8.3.1; 8.3.2). Высушенные особи далее были смонтированы на медные пины с использованием ортодонтического воска для изучения на микротомографах SkyScan 1270 и 1272 (Bruker, Бельгия). Параметры напряжения и силы тока подбирались эмпирически для каждого образца (Таблица 2.2). Полученные данные обрабатывались в программе NRecon (BrukerMicroCT) для отсеивания шумов и удаления артефактов сканирования. Анализ полученных данных производился в программе CTvox.

2.3 Изучение морфологии отдельных спикул

2.3.1 Внешняя морфология спикул

Выделение спикул. Для изучения отдельных спикул в составе спикульного комплекса были отпрепарированы различные участки тела 60 экземпляров *O. muricata* (нога, нотум, папиллы, ринофоры). Фрагменты тела были помещены в 10% раствор гипохлорита натрия (NaOCl) на предметное стекло с лункой или чашку Петри диаметром 2,5 см для растворения мягких тканей. Время экспозиции в растворе гипохлорита натрия зависело от размеров и толщины фрагмента тела, занимало от 2 до 15 мин при комнатной температуре. Наблюдение за растворением тканей происходило с помощью бинокляров Ломо MSP1, MSP2 (Ломо, Россия), Olympus SZ51 (Olympus, Япония), Nikon C-LEDS (Nikon Corporation, Япония), Leica CLS 150X (Leica Biosystems Division of Leica Microsystems Inc., США). После растворения мягких тканей спикулы отмывались в трех сменах дистиллированной водой.

Световая микроскопия. Внешняя морфология – форма и размер спикул, была изучена под световыми микроскопами Leica DM 2500 (Leica Biosystems Division of Leica Microsystems Inc., США) и Nikon Eclipse-200 (Nikon, Япония). Промеры спикул осуществлялись по их главной (наибольшей) оси с использованием окулярной или электронной линейки.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Внешняя морфология отдельных спикул более подробно была изучена методом сканирующей электронной микроскопии. Для этого спикулы, очищенные от мягких тканей, как указано выше (Приложение 8.3.1; 8.3.2), были смонтированы на алюминиевые столики для СЭМ на углеродный скотч или лак для ногтей. Далее объекты были напылены золотом или смесью

золота, платины и палладия с помощью устройства для нанесения ионного покрытия Eiko IB3 (EIKO Corporation, Япония) в течении 7-15 мин. Изучение проводилось на микроскопах CamScan S2 (Cambridge Instrument Scientific Company, Великобритания), Hitachi S405A (Hitachi, Япония), JEOL JSM – 6380 L, JEOL JSM- 7000 (JEOL, Япония) и Quattro-S (Thermo Fisher Scientific, Чешская Республика).

2.3.2 Внутренняя морфология спикул

Внутренняя структура спикул. Для изучения внутренней структуры спикул моллюск целиком или фрагмент тела со спикулами были зафиксированы 2,5 % ГА, дегидратированы и высушены в критической точке (Приложение 8.3.1; 8.3.2). Далее из высушенных фрагментов были изготовлены сломы с помощью препаровальных игл, а также – срезы с помощью лезвий. Изучение внутренней структуры спикул проводилось по вышеописанной методике.

Гистология и ультратонкое строение. Для изучения полутонкого и ультратонкого строения тканей и спикул различные фрагменты тела *O. muricata* или моллюски целиком были зафиксированы 2,5% ГА после предварительного расслабления (Приложение 8.3.1; 8.3.2). Выбор буфера изменялся по мере исследований, были использованы 0,1М фосфатный буфер, 0,1М буфер Миллонига (рН=7.2-7.4) (Millonig, 1964), 0,2М какодилатный буфер и модифицированный какодилатный буфер (Приложение 8.3.1; 8.3.2). Отработка метода показала, что наиболее удачные фиксации были получены с использованием модифицированного какодилатного буфера. После фиксации объекты отмывали от фиксатора в соответствующем буфере, затем помещали в раствор 1% тетраоксида осмия на аналогичном буфере для постфиксации (Приложение 8.3.1; 8.3.2). Для дальнейших манипуляций объекты были декальцинированы с использованием 5% раствора этилендиаминоуксусной кислоты (ЭДТА), дегидратированы и заключены в смолу Spurr (Sigma-Aldrich, США) или Epon (Electron Microscopy Sciences, США). (Приложение 8.3.1; 8.3.2).

Полученные смоляные блоки были заточены с помощью надфилей и лезвий. Для создания серий полутонких и ультратонких срезов широкая грань пирамиды промазывалась смесью резинового клея «Момент» с ксилолом. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм были изготовлены с помощью микротомов LKB Bromma 2088 Ultratome V (LKB, Швейцария), Dupont MT–5000 (DuPont Company, США), ультратонкие срезы толщиной 70-80 нм – с помощью ультратомов Leica EM UC6 и UC7 (Leica, Германия). Для изготовления срезов были использованы алмазные ножи Histo, Histo Jumbo, (Diatome, Biel, Швейцария) и PELCO

12785SU (Ted Pella, США). Полутонкие срезы были окрашены смесью 1% толуидинового и 0,2% метиленового синего на 1% растворе тетрабората натрия (Миронов и др., 1994) в течении 30-90 сек. Изучение полутонких срезов осуществлялось с помощью световых микроскопов Минимед, Nikon Eclipse-200, Nikon Eclipse Ci (Nikon, Япония). Оцифровка срезов осуществлялась с помощью микроскопов Nikon и слайд сканнера Olympus BX61VS (Olympus, Япония).

Для дальнейшего изучения на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ) ультратонкие срезы были отконтрастированы с помощью 4% водного раствора уранилацетата (45-60 мин, при температуре 37°) и 0,4% раствора цитрата свинца (5-15мин, в темноте при комнатной температуре) по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Полученные срезы были изучены с помощью трансмиссионных электронных микроскопов JEM-1011, JEM-100B и JEOL JEM-1400 Flash (JEOL, Япония). Полученные электроннограммы были смонтированы в панорамы с использованием программного обеспечения PTGui 8.3.7 и Autorano Giga.

Трехмерная реконструкция. Для визуализации строения склероцитов были изготовлены трехмерные реконструкции по сериям полутонких срезов. Для этого оцифрованные с помощью слайд сканнера Olympus BS 61 VS изображения срезов были преобразованы в 8-битный формат с помощью программного обеспечения Irfan View 4.57. Затем выровнены в стопки в программе AMIRA 5.2.2 (Amira Visaging GmbH, Германия). Компьютерная трехмерная реконструкция осуществлялась в программе Imaris 7.0.0 (Bitplane AG, Zurich, Швейцария), используя метод, описанный Рутенштейнером и Хесом (Ruthensteiner, Heß, 2008).

2.4 Химический состав спикул

В настоящей работе был изучен элементный и химический состав спикул *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза.

Элементный состав спикул. Изучение элементного состава спикул проводили методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС) на микроскопе JEOL JSM-7000. Для получения качественных данных были изучены сломы фрагментов тела 15 особей *O. muricata* со спикулами. Пробоподготовка образцов была аналогична СЭМ. Анализ осуществляли путем картирования выбранной области со спикулами при напряжении 10kV в течении 120 сек.

Рамановская спектроскопия. Помимо изучения элементного состава спикул был изучен химический состав спикул методом Рамановской спектроскопии на 15 особях *O. muricata* разных размеров. Для анализа были использованы отдельные спикулы, очищенные от органики с помощью гипохлорита натрия. Отдельные спикулы были смонтированы на предметное стекло с помощью углеродного скотча. Анализ проводился на спектрометрах Olympus U-CTR30-2 (Olympus, Япония) и LabRAM HR Evolution (Horiba, Франция), оборудованными лазерами с длиной волны 532 нм. Измерение Рамановского сдвига производилось на 5 спикулах для каждой особи, в каждой спикуле были проанализированы минимум три точки. Параметры съемки: экспозиция 1000, мощность 40%, размер фокального пятна 10 мкм.

2.5 Минерализация спикул

Для изучения процесса минерализации спикул, а именно для выявления зон отложения кальция в них, по 15 особей *O. muricata* разных размерных групп помещали в раствор кальцеина (динатриевой соли кальцеина; Honeywell Fulka, Santa Cruz Biotechnology) с концентрацией 10 мг/мл морской воды. Все особи содержались в пластиковых чашках Петри диаметром 2,5 см в течении 21 дня при плюс 10°C. Раствор меняли каждые два дня на свежий. Мониторинг изменений проводился с помощью стандартного набора фильтров изотиоцианата флуоресцеина (FITC) под эпифлуоресцентным микроскопом Leica DM2500, оснащенный цифровой камерой Leica DFC 320 (Leica), лампой ebq-100 (Leica, USA) и программным обеспечением LAS Store and Recall версии 4.1 (Leica). После экспозиции в кальцеине моллюски помещались в чистую фильтрованную морскую воду для отмывки флуорохрома минимум на 12 часов. При определении существенных изменений спикулы были отпрепарированы и изучены с помощью конфокального микроскопа Nikon A1R-A1 (Nikon Corporation, Япония), а также эпифлуоресцентного микроскопа Nikon NiE (Nikon Corporation, Япония).

2.6 Иммуногистохимия и флуоресцентное окрашивание

Для проведения исследований методом иммуногистохимии *O. muricata* были изучены с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). Для этого фрагменты тела *O. muricata* или моллюски целиком были зафиксированы с помощью 4% раствора параформальдегида (ПФА) на фосфатном буфере (Приложение 8.3.2). После

отмывки от фиксатора буфером производилась окраска ядер с помощью красителя Propidium Iodide или DAPI, мышц – Phalloidin fluorescencein (Приложение 8.3.2). Для визуализации элементов нервной системы, а также коллагена была применена окраска с использованием антител. При выполнении любой окраски также был осуществлен контроль с добавлением только вторичных антител для проверки специфичности связывания. Для подготовки препаратов перед изучением на конфокальном микроскопе образцы были просветлены с помощью глицерина восходящей концентрации или изопропиловым спиртом восходящей концентрации с раствором Murray's Clear (Приложение 8.3.2).

2.7 Методы изучения молекулярных механизмов минерализации

2.7.1 Синтез антисмыслового РНК зонда. *In situ* гибридизация

Выбор целевого гена. На основе литературных данных были выбраны последовательности генов карбоангидраз, участвующих в процессе минерализации у других беспозвоночных животных. Далее был осуществлен поиск выбранных последовательностей в аннотированном транскриптоме *O. muricata* (Nikitenko et al., 2024) и выбрана последовательность транскрипта карбоангидразы для проведения гибридизации *in situ* и визуализации паттернов экспрессии у *O. muricata* разных размеров.

Синтез зонда. Для проведения гибридизации *in situ* был синтезирован антисмысловой РНК зонд путем трансформации компетентных клеток *Escherichia coli* (Приложение 8.3.4). Для этого сначала была выделена и очищена тотальная РНК из 5 особей *O. muricata*. Качество выделенной РНК было оценено методом гель электрофореза.

Обратная транскрипция, получение дц-кДНК. Полученная РНК была использована в качестве матрицы для обратной транскрипции с использованием коммерческого набора Mint по протоколу производителя (кат. #SK005, Евроген, Россия). В результате реакции получили первую цепь к-ДНК, которую затем использовали для приготовления двуцепочечной кДНК (дц-кДНК). Количество полученной дц-кДНК было увеличено путем реакции ПЦР с использованием амплификатора Mastercycler gradient (Eppendorf, Германия) (Приложение 8.3.4).

Подбор праймеров. Для выбранного транскрипта были подобраны специфичные праймеры с использованием программного обеспечения Primer-BLAST (NCBI, США). Синтез праймеров был осуществлен компанией Евроген (Россия).

Получение целевого фрагмента исследуемого гена. Для получения фрагмента гена интереса дц-кДНК была использована в качестве матрицы для ПЦР со специфичными

праймерами (Приложение 8.3.5). Продукт ПЦР реакции очищался с использованием ацетата натрия и изопропанола (Приложение 8.3.4). Качество ПЦР продуктов оценивали с помощью электрофореза в агарозном геле.

Лигирование. Лигирование ПЦР продукта в вектор pAL2-Tv для дальнейшего клонирования было проведено с использованием коммерческого набора Quick-TA (кат.#ТАК02, Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Количество ДНК вставки брали, исходя из соотношения с ДНК вектора (10:1). Лигировали 12 часов при температуре 4°C.

Трансформация компетентных клеток. Клонирование. Синтез антисмыслового РНК зонда. Направленный перенос вставки был осуществлен в компетентные клетки XL1-Blue *E. coli* методом теплового шока (Приложение 8.3.4). Далее колонии были отобраны по фенотипическому признаку, осуществлен скрининг методом ПЦР. Отобранные клоны, несущие рекомбинантные плазмиды, переседали в 5 мл жидкой среды Лурия-Бертани (LB) с ампициллином (50 мкг/мл) и растили культуру в бактериальном шейкере в течение ночи (плюс 37°C; 220 об/мин) (Приложение 8.3.3). Из жидкой культуры *E. coli* была выделена плазмидная ДНК с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) по протоколу производителя.

Выделенную ДНК секвенировали для определения направления вставки. После чего ДНК-матрица была амплифицирована и очищена. Синтез антисмыслового РНК зонда происходил путем транскрипции *in vitro*. Полученная РНК была очищена по протоколу, описанному выше. Очищенную РНК анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле. Раствор РНК доводили стерильной водой до концентрации 100 нг/мкл, затем разбавляли формамидом до итоговой концентрации 50 нг/мкл. Получившийся РНК зонд хранили при минус 20°C.

2.7.2 Гибридизация *in situ*

Фиксация материала. Для проведения гибридизации *in situ* 75 особей были зафиксированы 4% раствором ПФА на фосфатном буфере в течении 2 часов при комнатной температуре на качалке, после чего отмывались соответствующим буфером. Далее буфер сменяли холодным метанолом (минус 20°C). Объекты инкубировали в чистом метаноле минимум ночь при минус 20°C (Приложение 8.3.4). Дальнейшие манипуляции с объектами проводили либо в пробирках, либо в самодельных сеточках.

Регидратация и пермеабиллизация объектов. Регидратацию объектов проводили смесью ПТВ и метанола (Приложение 8.3.4). Далее пермеабиллизировали протеиназой К (концентрацией 20 нг/мкл) в течении 30 сек-2 мин в зависимости от размера объекта. Действие протеиназы останавливали раствором глицина.

Блокировка и гибридизация. Объекты инкубировали в триэтанолаmine и растворе триэтаноламина и уксусного ангидрида (Приложение 8.3.4), отмывали ПТВ и дофиксировали 4% ПФА. Предгибридизацию начинали после отмывки фиксатора в буфере для гибридизации при 58°C в водяной бане с перемешиванием. Перед началом гибридизации с объектом, зонды смешивали с гибридизационным буфером до рабочей концентрации 1 нг/мкл и инкубировали при 80°C в течении 5 мин. Затем гибридизовали объект с зондами в течении 36 часов при 58°C.

Отмывку от зондов осуществляли смесью гибридизационного буфера и буфера цитрата натрия (SSC, pH=7) в разных соотношениях. Блокировку осуществляли с помощью блокирующего раствора (1% Блокирующий реагент, Roche, Швейцария на растворе малеиновой кислоты (МАБ)), затем инкубировали в антителах к дигоксигенину, конъюгированными с щелочной фосфатазой в течение ночи при плюс 4°C. Отмывку от антител проводили МАБ, затем переводили в буфер щелочной фосфатазы без ионов магния и полный – с ионами магния. Далее проводили хромогенную реакцию с щелочной фосфатазой в темноте с визуальным контролем появления чёткого сигнала. В качестве субстрата для щелочной фосфатазы использовали стоковый раствор NBT/BCIP. Стоп реакцию осуществляли с помощью дистиллированной воды и 96% этанола.

Далее объекты просветляли с использованием раствора Murray's Clear и осуществляли фотофиксацию результатов на бинокляре Leica M165C и микроскопах Nikon EclipseTi, Leica DM2500, оснащенных камерами Leica DFC420, Nikon DS-Fi2 и Leica DFC420C соответственно.

2.8 Изучение регенерации спиккулярного комплекса

Изучение регенерации было проведено на 214 особях *O. muricata* размером 6-12 мм. *Onchidoris muricata* содержались в стеклянных чашках объемом 0,5 л в естественной фильтрованной морской воде при температуре плюс 10-12°C. Вместе с моллюсками в чашках располагался субстрат в виде камней или красных водорослей с объектами питания – мшанками *E. pilosa*. Смена морской воды осуществлялась каждые два дня.

Регенерация была изучена на выростах тела – ринофорах и папиллах. Перед изучением регенерации была изучена нормальная морфология ринофоров и папилл морфологическими методами, описанными выше. Для изучения регенерации ринофоров были поставлены 3 серии экспериментов: 1) у ринофора были удалены верхушка и 2 складки под ней (в одной повторности), 2) ринофор удалялся полностью вместе с рахисом (в четырех повторностях) 3) у ринофора была удалены складки до рахиса (в двух повторностях). Для изучения регенерации папилл были удалены папиллы в околожаберной области (в двух повторностях). В каждой экспериментальной группе было минимум по 20 половозрелых *O. muricata*. Помимо экспериментальной группы была выделена контрольная группа с интактными папиллами и ринофорами. Операции по удалению проводили после расслабления в растворе магнезии при помощи микрохирургических ножниц под бинокляром.

Мониторинг состояния особей производился ежедневно в течении 27 дней с помощью бинокляров Lomo MSP1, MSP2 (Lomo MA, Russia) и микроскопа Leica DM2500. Фотографирование особей осуществлялось с помощью бинокляров Leica CLS 150X, Leica M165C и микроскопа Leica DM2500, оснащенных камерами. Ключевые стадии регенерации фиксировались каждые 2 дня для изучения методом СЭМ и ТЭМ. Фиксация особей, пробоподготовка и изучение образцов методами проводились по вышеописанной методике.

3 Результаты

Для решения поставленных задач в настоящей работе были проведены исследования морфологии спиккулярного комплекса и отдельных спикул *Onchidoris muricata* как в нормальном развитии на разных стадиях онтогенеза, так и в процессе посттравматической регенерации. Первая часть главы результатов посвящена нормальной морфологии тела *O. muricata*, вторая – онтогенетическим преобразованиям спикул, третья – процессу регенерации и спикулогенезу.

3.1 Преобразование нормального строения тела *Onchidoris muricata*

В настоящей работе были изучены особи *O. muricata* на разных стадиях онтогенеза: ранние ювенили сразу после метаморфоза (линейный размер тела от 100 мкм до 1 мм), ювенили (от 1 до 4 мм) и половозрелые особи (от 4 до 12 мм) (Рис. 1.7). Для удобства введены группы I, II и III, соответствующие стадиям онтогенеза *O. muricata*.

Развитие *O. muricata*, как и других голожаберных моллюсков, включает личиночную стадию – велигера, а также процесс метаморфоза. После метаморфоза тело *O. muricata* состоит из мускулистой ноги, головы и нотума, который нависает над ними (Рис. 1.7; 3.1; 3.2). На переднем конце тела расположены хемосенсорные подвижные сократимые головные щупальца – ринофоры, на заднем – жабры. Сразу после метаморфоза нотум гладкий, спустя два дня на дорсальной стороне нотума формируются многочисленные булабовидные выросты – папиллы (Рис. 3.2; 3.3). Папиллы покрывают всю дорсальную сторону нотума, выполняют защитную функцию. В апикальной части папилл имеются крупные субэпидермальные железы, остальная часть папиллы заполнена спикулами (Рис. 3.3). Сразу после метаморфоза ринофоры ювенилей гладкие (Рис. 1.7; 3.2И), затем приобретают складчатую структуру (Рис. 1.7; 3.4). Ринофоры *O. muricata* состоят из гладкого основания – рахиса (Рис. 3.4А, Д, Е), и складчатой части – клавиуса (Рис. 3.4 А, Б, Г, Д), которая оканчивается оформленной верхушкой ринофора (Рис. 3.4Б, В). У взрослых особей количество складок варьирует от 7 до 9. Ринофор – подвижный сократимый орган, который способен втягиваться в карман ринофора. Более подробно внутренняя морфология ринофора и принцип его работы будет рассмотрен в п. Регенерация.

Стенка тела *O. muricata* состоит из покровного эпителия, соединительно-тканного слоя из внеклеточного матрикса, образованного коллагеновыми волокнами, нервных и мышечных элементов, а также хорошо развитого спиккулярного комплекса. В процессе

исследований было подробно изучено строение всех элементов стенки тела, но в данной работе фокус смещен на спикүлогенез и строение тканей, непосредственно связанных с этим процессом.

3.2 Преобразование спикүл *Onchidoris muricata*

3.2.1 Спикүльный комплекс

Спикүлы в теле *O. muricata* расположены практически во всех компартаментах – в ноге, нотуме, папиллах и ринофорах.

Внешняя морфология спикүл. Спикүльный комплекс *O. muricata* на всех стадиях онтогенеза сформирован одноосными, двуосными, трехосными и четырехосными спикүлами (Рис. 3.5). Преобладающим типом спикүл в теле является четырехосный. Размер спикүл тела варьирует в зависимости от размеров моллюска, чем он крупнее – тем больше диаметр и линейный размер самих спикүл. Длина спикүл может достигать от 50 до 300 мкм, диаметр от 3 до 30 мкм. Внешняя морфология спикүл ринофоров отличается от морфологии спикүл стенки тела (Рис. 3.5). Спикүлы ринофоров чаще всего изогнуты, имеют вторичные оси, отходящие преимущественно от центра главной оси. Диаметр спикүл ринофора меньше спикүл тела – достигает максимум 20 мкм. (Таблица 3.1).

Спикүльные тракты и сети. Спикүлы в теле *O. muricata* расположены не хаотично, а формируют оформленные скопления – тракты (Рис. 3.2А–Е; 3.6–3.8).

Формирование спикүльных трактов стремительно происходит у особей I группы (ювенилей сразу после метаморфоза), что напрямую связано с развитием частей тела моллюска (Рис. 3.2). Первым формируется горизонтальный тракт центральной части нотума, спикүлы в котором располагаются во фронтальной плоскости параллельно друг относительно друга, но перпендикулярно переднезадней оси тела. Горизонтальный тракт центральной части нотума ювенилей сразу после метаморфоза сформирован немногочисленными короткими спикүлами с тупыми концами (Рис. 3.2А, Д, Ж). При разрастании нотума формируется горизонтальный тракт его периферической части (Рис. 3.2Б, В, З, И; 3.6). Здесь спикүлы располагаются перпендикулярно краю нотума, но параллельно друг другу (Рис. 3.2). При обособлении папилл, в их основании происходит формирование звездчатых трактов в переходной зоне папиллы в нотум (Рис. 3.6Е; 3.8Д, Е). Спикүлы расходятся радиально от основания папиллы. Внутри самих папилл формируется вертикальный тракт, спикүлы в котором располагаются в саггитальной плоскости тела (Рис. 3.3Г). Вертикальный тракт сформирован двумя типами спикүл – четырехосными и двухосными (Рис. 3.3Г). Четырехосные спикүлы пронизывают всю папиллу, обращены

вторичными осями к базальной части папиллы, в апикальной части – выходят за плоскость поверхности папиллы, но остаются под покровными эпителием (Рис. 3.3 А, Б, Г). Двухосные спикулы короткие, располагаются между четырехосными спикулами по периферии папиллы в ее средней части (Рис. 3.3Г).

Спикулы центральной части ноги лежат во фронтальной плоскости параллельно друг относительно друга, но перпендикулярно переднезадней оси тела и формируют горизонтальный тракт ноги (Рис. 3.6Б; 3.7Д).

У особей II группы увеличивается длина спикул, спикульные тракты становятся более плотно расположены друг к другу (Рис. 3.6). Различие трактов *O. muricata* II и III группы наблюдается лишь в линейных размерах спикул формирующих их, а не в конфигурации трактов (Рис. 3.6-3.8).

В ринофорах впервые описана отдельная спикульная сеть, которая не сообщается со спикулами тела (Рис. 3.9; 3.10). Спикулы в ринофорах *O. muricata* формируют колодеце-подобную сеть (Рис. 3.9; 3.10). Подобная морфология спикульной сети напрямую связана с морфологией самих ринофоров. В каждую складку ринофора отходят две спикулы под углом друг к другу (Рис. 3.10 А, В), а центральная часть сети сложена 4-8 спикулами (Рис. 3.10 Б, Г), причем спикулы расположены по окружности «внахлест» друг к другу, что оставляет подвижным сложную сеть при сокращении или расслаблении органа (Рис. 3.10 Д, Е).

Подвижность спикульного комплекса. Несмотря на плотный и жесткий спикульный комплекс, спикулы в составе трактов остаются подвижны относительно друг друга на всех стадиях онтогенеза *O. muricata*, что позволяет сохранить пластичность тела при движении. Изучение ультратонкой морфологии различных участков тела *O. muricata* показало отсутствие клеточных контактов между склероцитами и мышечными клетками на всех изученных стадиях (Рис. 3.11).

3.2.2 Преобразование стенки тела

Стенка тела *O. muricata* состоит из псевдостратифицированного покровного эпителия, соединительно-тканного слоя из внеклеточного матрикса, образованного коллагеновыми волокнами, нервных и мышечных элементов, а также хорошо развитого спикульного комплекса (Рис. 3.12).

Строение и преобразование покровного эпителия. Покровный эпителий преобразуется на постличиночных этапах онтогенеза. В настоящей работе отмечено, что эпителий ноги и папилл устроен сходным образом у *O. muricata* всех возрастов. В то время

как эпителий ринофоров и нотума претерпевают существенные онтогенетические преобразования.

Эпителий ноги. В покровах ноги *O. muricata* отмечены ресничные столбчатые клетки и железистые клетки (Рис. 3.13; 3.14). Под эпителием расположено большое количество крупных субэпидермальных желез (Рис. 3.13А). Железистые клетки в ноге имеют гранулированный секрет (Рис. 3.13Б, Г, Д). Все типы желез обладают апокриновым типом секреции (Рис. 3.13Б, Д; 3.14). В базальной части эпителия отмечены клетки с вакуолью, которая занимает почти весь объем клетки. Вакуоль таких клеток имеет мелкозернистое содержимое (Рис. 3.13Б, Г, Д). Между собой клетки соединены адгезивными и септированными контактами (3.13Е).

Эпителий папилл. Морфология эпителия папилл одинакова у особей всех размеров (Рис. 3.15; 3.16). Основная поверхность папиллы покрыта однослойным эпителием, состоящим из столбчатых и железистых клеток (Рис. 3.15А, В, Д; 3.16А, Б, В). Между собой клетки соединены адгезивными и септированными контактами (Рис. 3.15Б, Е). Переходная зона между папиллой и нотумом выстлана псевдостратифицированным железистым эпителием с крупными вакуолями (Рис. 3.15Г; 3.16Д).

Эпителий ринофоров. Эпителий ринофоров состоит из столбчатых эпителиальных клеток, несущих реснички, и одиночных железистых клеток (Рис. 3.17–3.19). Уникальной чертой эпителия ринофоров является наличие многочисленных вакуолей с аморфным хитином в апикальной части клеток (Рис. 3.17А, Б, Г; 3.18А–В). Помимо морфологических изменений в структуре самого ринофора с возрастом моллюска наблюдаются изменения в строении эпителия. Онтогенетические изменения в эпителии ринофора связаны с увеличением количества хитиновых гранул, а также эпителиальных желез (Рис. 3.19). У ювенилей эпителий представлен столбчатыми клетками с хитиновыми вакуолями, расположенными в один ряд, железистый компонент развит слабо (Рис. 3.17). При появлении складок ринофора, количество рядов хитиновых гранул в клетках увеличивается. У взрослых особей достигает 3-4 рядов в апикальной части клеток (Рис. 3.18В). Разнообразие эпителиальных желез у взрослых особей выше, чем у ювенилей. Помимо желез с однородным электронно-прозрачным содержимым, отмечены железы с гранулированным и мелкозернистым секретом (Рис. 3.18А, Г–Ж).

Эпителий нотума. Выделено три типа строения эпителия нотума: ювенильный (рыхлый) (Рис. 3.20), переходный (Рис. 3.21) и взрослый (Рис. 3.22). Ювенильный эпителий характерен для особей первой группы размером до 200 мкм и представлен уплощенными

клетками с большими межклеточными промежутками между ними (Рис. 3.20А, Б; 3.23А, Б). Переходный тип эпителия также встречается у особей первой группы размером до 2 мм (Рис. 3.21; 3.23В, Г). Характерной особенностью эпителия этого типа является появление столбчатых и сильно вакуолизированных клеток, соединенных адгезивными и септированными контактами, а также наличие немногочисленных участков с выраженным межклеточным пространством подобно ювенильному эпителию (Рис. 3.21). Взрослый тип эпителия характерен для особей II и III групп, представлен столбчатыми и железистыми клетками (Рис. 3.22; 3.23Д, Е). Клетки плотно соединены друг с другом, межклеточные пространства отсутствуют.

На всех стадиях постличиночного развития в эпителии *O. muricata* впервые были отмечены специфические клетки в базальной части эпителия с крупной вакуолью, которая занимает почти весь объем клетки. Содержимое вакуоли представлено мелкозернистыми гранулами/включениями, ультратонкое строение которых напоминает поперечно-срезанные коллагеновые волокна, реже встречается электронно-прозрачное содержимое. Такие клетки были названы Икс клетками (X клетки), поскольку их функция достоверно не ясна. Икс клетки встречаются в эпителии всех частей тела моллюска – в ноге, в нотуме, в папиллах и в ринофорах (Рис. 3.13Б; 3.15Г; 3.17А, В; 3.18Б; 3.20Д; 3.21А, Г, Д; 3.22А). Икс клетки всегда плотно прилегают к базальной мембране, никогда не контактируют с внешней средой – их апикальная часть всегда остается прикрыта соседними клетками эпителия и соединяется с ними адгезивными контактами.

Существенным онтогенетическим преобразованием является изменение количества и положения Икс клеток. Отмечено, что наибольшее число Икс клеток встречается у особей I и II группы, а с возрастом их количество уменьшается. При этом в эпителии ювенилей Икс клетки формируют многочисленные выпячивания в субэпидермальное пространство (Рис. 3.21Д), однако целостность базальной мембраны при этом сохраняется. У взрослых особей объем вакуоли Икс клеток меньше, чем у ювенилей. Выпячивания Икс клеток в субэпидермальное пространство обнаружены у взрослых особей только в эпителии ринофоров, в других частях тела не встречаются.

Внеклеточный матрикс и клеточные элементы, расположенные в нем. На всех стадиях развития *O. muricata* под покровным эпителием располагается слой внеклеточного матрикса, состоящий из коллагеновых волокон, что показано методами ТЭМ и иммуногистохимии (Рис. 3.24; 3.25). В толще матрикса обнаружены нервные элементы, мышцы, склерциты, а также большое количество фибробластов, ассоциированных со спикулами и другие клеточные элементы, функция которых достоверно не определена. Плотность расположения коллагенового матрикса в стенке тела у особей всех размеров не

однородна – наибольшая плотность наблюдается вокруг спикул (Рис. 3.12; 3.24; 3.26). У ювенилей коллагеновый матрикс начинает формироваться только вокруг спикул, далее матрикс разрастается, окружая спикулы центральной зоны нотума (Рис. 3.24А; 3.26А), у взрослых особей еще и у спикул краевой части нотума (Рис. 3.24Д; 3.26В).

Интересной особенностью является ассоциация фибробластов со спикулами (Рис. 3.12; 3.26). Фибробласты имеют амебоидную форму, несут многочисленные отростки (Рис. 3.27Е, Ж), в которых располагаются электронно-плотные гранулы размером 0,1-0,3 мкм. Методом иммуногистохимии показано, что фибробласты содержат коллагеновые волокна (Рис. 3.26Г, Д). В местах контакта фибробласта со склероцитом около мембраны фибробласта наблюдается большое количество везикул (Рис. 3.27В, Г). Отмечено, что ультраструктура фибробластов одинакова для всех стадий развития *O. muricata* (Рис. 3.27).

Степень ассоциации фибробластов со склероцитами в субэпидермальном пространстве отличается в разных группах *O. muricata*. У ювенильных особей всегда к склероциту плотно прилегает один или несколько фибробластов, в то время как у особей третьей группы, фибробласты, если и есть, то располагаются далеко от спикул (Рис. 3.12; 3.26А–В).

3.2.3 Преобразование склероцитов

В настоящей работе впервые изучено строение клеток, в которых формируются и в дальнейшем располагаются спикулы безраковинных моллюсков на примере *O. muricata* (Рис. 3.28). Данные клетки были названы склероцитами, по аналогии со спикулогенными клетками других беспозвоночных. Склероциты располагаются в субэпидермальном пространстве *O. muricata* на всех этапах постличиночного развития (Рис. 3.28А, Г, Ж). В склероцитах можно выделить перинуклеарное пространство с ядром и клеточными органеллами (Рис. 3.28Б, Д, З) и крупную вакуоль со спикулой, которая занимает бóльший объем клетки. Впервые прослежено, что спикулы расположены внутриклеточно в вакуоли на протяжении всей жизни *O. muricata* и никогда не выходят во внеклеточное пространство. Один склероцит всегда соответствует одной спикуле, что показано с использованием трехмерной реконструкции по серии полутонких срезов (Рис. 3.3В). Размер вакуоли соответствует размеру спикулы, может достигать более 300 мкм, форма вакуоли соответствует форме спикулы. Несмотря на различия во внешней морфологии спикул тела и ринофоров, ультратонкое строение склероцитов принципиально одинаково (Рис. 3.29).

Онтогенетические изменения *O. muricata* также отражаются на тонкой морфологии самих спикул (Рис. 3.28). На ранних этапах постличиночного развития у особей первой группы склероциты имеют высокую синтетическую активность. Вакуоль склероцитов имеет электронно-прозрачное однородное содержимое, включения встречаются редко (Рис. 3.28А). У моллюсков второй и третьей группы синтетическая активность склероцитов падает (Рис. 3.12Г, Е; 3.28Д, З). У *O. muricata* второй группы вакуоль склероцитов содержит включения в виде волокон, по ультраструктуре напоминающие внеклеточный матрикс или коллагеновые волокна (Рис. 3.28Г). Локализация волокон в вакуоли склероцитов отличается, в некоторых случаях они занимают центральное положение, в других – пристеночное. По форме содержимое может быть округлым, в виде тяжей или в виде концентрических слоев. У особей третьей группы волокнистое содержимое вакуоли отсутствует (Рис. 3.28Ж).

3.2.4 Внутренняя морфология спикул

В настоящей работе впервые показано разнообразие внутренней структуры спикул у голожаберных моллюсков на разных стадиях онтогенеза на примере *O. muricata* (Рис. 3.30). Всего у *O. muricata* отмечено шесть типов внутренней структуры спикул. Встречаются полые (Рис. 3.30А), губчатые (Рис. 3.30Б), концентрические (Рис. 3.30В, Г) смешанные (Рис. 3.30Д, Е, Ж, З) и монолитные (Рис. 3.30И) спикулы. В ринофорах нами были детектированы спикулы с тремя типами внутренней структуры: спикулы с рыхлым содержимым у ранних ювенилей (Рис. 3.30К), спикулы с центральной частью заполненной концентрическими и радиальными тяжами неправильной формы (не строго перпендикулярными поверхности спикул, в отличие от спикул тела) у неполовозрелых особей (Рис. 3.30Л), а также монолитные спикулы с однородным содержимым у взрослых особей (Рис. 3.30К, М). Полые спикулы – имеют мягкую оболочку и полую внутреннюю часть (Рис. 3.30А). Поверхность губчатой спикулы имеет неоднородную поверхность, напоминающую пористую структуру (Рис. 3.30Б). Спикулы с концентрической внутренней структурой состоят из многочисленных слоев, при этом центральная часть спикулы может быть полой или иметь вид рыхлого содержимого (Рис. 3. 30В, Г). Смешанные спикулы могут иметь разную морфологию. Встречаются спикулы с радиальной и концентрической исчерченностью (Рис. 3.30Д), радиальной исчерченностью по большей площади спикулы и рыхлым центром (Рис. 3.30Е), с элементами радиальной, концентрической, монолитной структуры (Рис. 3.30Ж), также спикулы могут включать элементы радиальной исчерченности по периферии спикулы

и монолитный однородный центр (Рис. 3.30З). Монолитные спикулы имеют однородное плотное содержимое (Рис. 3.30И).

Впервые отмечено, что тип внутренней структуры спикул коррелирует с возрастом моллюска. У особей первой группы преобладают полые и губчатые спикулы, концентрические спикулы встречаются реже, другие типы не обнаружены. У особей второй группы с размером тела от 2 до 6 мм встречается наибольшее количество типов внутренней структуры спикул – концентрические, спикулы с элементами радиальных и концентрических слоев, монолитные. Среди половозрелых особей третьей группы преобладающим является монолитный тип спикул, однако встречаются и спикулы с монолитной частью и радиальной исчерченностью по периферии.

3.2.5 Химический состав спикул

В основе спикул *O. muricata*, подобно другим беспозвоночным, имеется органическая матрица. Показано наличие коллагена в спикулах *O. muricata* ранних ювенилей сразу после метаморфоза и ювенилей (Рис. 3.25). У моллюсков до 2 мм коллаген распределен диффузно по всему объему спикул (Рис. 3.25А, Б), в то время как у особей размером от 2 до 4 мм, коллаген детектирован в концевых зонах спикул и по их периферии (Рис. 3.25В–Д), в некоторых спикулах также был отмечен коллагеновый тяж внутри (Рис. 3.25Г). Наличие коллагена внутри спикул половозрелых особей показано не было (Рис. 3.25Е, Ж). Наличие матрикса внутри вакуолей склероцитов также был отмечен на ультраструктурном уровне, что было отмечено выше (Рис. 3.28Г).

Энерго-дисперсионный анализ (ЭДС) спикул *O. muricata* разных возрастов позволяет оценить элементный состав спикул качественно (Рис. 3.31–3.33). В составе спикул на разных стадиях онтогенеза помимо углерода, кислорода, были детектированы кальций, магний и фосфор. Картирование элементов в спикулах *O. muricata* позволило определить, что распределение элементов отличается в спикулах на разных стадиях онтогенеза. Фосфор в рыхлых спикулах ювенилей распределен равномерно (Рис. 3.31), в спикулах со смешанной внутренней структурой наибольшая плотность фосфора отмечена только по периферии – в слоистой части спикулы (Рис. 3.32), незначительные его количества обнаружены в монолитной части (Рис. 3.33). При анализе монолитных спикул половозрелых особей основное количество фосфора сконцентрировано в обкладке спикулы (Рис. 3.33). Магний и кальций распределены равномерно по всей площади слома спикул *O. muricata* и не формируют отдельные скопления.

Спикулы *O. muricata* были проанализированы с применением Рамановской спектроскопии. Показано, что спикулы на ранних этапах постличиночного развития мягкие, легко растворяются в растворе гипохлорита натрия (NaOCl), что свидетельствует о большом количестве органического матрикса в составе спикул. Спикулы половозрелых особей твердые. Однако, исследование спикул с применением Рамановской спектроскопии показало, что в спикулах как ювенилей, так и половозрелых особей содержится кальцит (Рис. 3.34). Спектр кальцита характеризуется острым пиком при волновых модах равных 1086 см^{-1} (симметричная мода растяжения карбонат-иона), 282 см^{-1} (либрационная мода) и 712 см^{-1} (изгиб в плоскости группы $(\text{CO}_3)_2$) (Рис. 3.34Б).

В некоторых спикулах положение основных колебательных мод отличалось от эталонного кальцита (Рис. 3.34В, Г). В этих случаях спектр характеризуется наличием пиков в положении либрационной моды ($281,3\text{-}281,7\text{ см}^{-1}$); изгиба в плоскости ($714,0\text{-}715,5\text{ см}^{-1}$); и симметричном растяжении ($1088,2\text{-}1088,4\text{ см}^{-1}$).

3.2.6 Минерализация спикул

В процессе развития *O. muricata* спикулы увеличиваются в линейных размерах, становятся более твердыми. Для идентификации процессов кальцификации спикул особи *O. muricata* разных размеров в течение 21 дня содержали в растворе флуорохрома динатриевой соли кальцеина, который является индикатором связывания ионов кальция (Рис. 3.35). Отмечено, что связывание кальция происходит у особей первой и второй группы *O. muricata* (Рис. 3.35А–Е). Кальцификация наблюдается в концевых участках спикул и менее интенсивно по всей поверхности (Рис. 3.35Б, В, Г). У половозрелых особей связывание флуорохрома происходит незначительно (Рис. 3.35Е), либо вовсе не происходит (Рис. 3.35Ж).

3.2.7 Молекулярные механизмы минерализации. *In situ* гибридизация

Для изучения молекулярных механизмов регуляции минерализации были проведены эксперименты по гибридизации *in situ*. Результаты эксперимента по гибридизации *in situ* в трех группах *O. muricata*, спикулы которых находятся на разных стадиях развития, показали различное паттернирование зон экспрессии карбоангидразы (CA01-3 (Приложение 8.3.5)) (Рис. 3.36; 3.37). Экспрессия гена карбоангидразы наблюдается в переходной зоне между ногой и нотумом у ранних ювенильных особей размером около 300 мкм (Рис. 3.37В–Д). У

особей, размер тела которых достигает 600 мкм, сохраняется паттерн окрашивания в переходной зоне, однако помимо этого визуализируется экспрессия в склероцитах нотума, расположенных по всей дорсальной стороне тела *O. muricata* за исключением спикул папилл (Рис. 3.37А, Б). Экспрессия карбоангидразы в переходной зоне нотума и ноги прекращается у моллюсков бóльшего размера (примерно 2-3 мм), однако продолжается в склероцитах (Рис. 3.37В–Ж). Окраска в склероцитах наблюдается по всей клетке, наиболее интенсивна в перинуклеарном пространстве (Рис. 3.37Б, Д, Е, Ж). У половозрелых *O. muricata*, спикулы которых по морфологическим признакам находятся на терминальной стадии развития, экспрессия гена карбоангидразы детектирована не была.

3.3 Регенерация

Для изучения регенерации в настоящей работе были выбраны спикульные выросты тела дорид – ринофоры и папиллы. Однако до настоящей работы нормальное строение папилл и ринофоров изучено не было. Описание внешней морфологии этих органов на примере *O. muricata* приводится в главе Результаты п. 3.1. Данные по внутреннему строению ринофора приводятся ниже, т.к. являются необходимым при описании регенерации.

3.3.1 Внутреннее строение нормального ринофора

Нервная система ринофора представлена крупным нервом ринофора, который дает ответвление в каждую складку ринофора и ветвится на конце (Рис. 3.38В; 3.39; 3.40А–В). Помимо крупного нерва в ринофоре имеются мелкие нервы, которые располагаются продольно вдоль ринофора, часто ассоциированы со спикулами и мышцами ринофора. Снаружи нерв ринофора имеет глиоподобную оболочку, в центре нерва располагаются отростки нейронов (Рис. 3.29). В центральной части можно выделить несколько компартментов, ограниченных друг от друга: 1) компартменты с хорошо заметными микротрубочками; 2) с микротрубочками и электронно-плотными гранулами; 3) крупные электронно-светлые компартменты с волокнистым содержимым.

Мышечная система ринофора хорошо развита – представлена многочисленными продольными тяжами мышц и более тонкими – косо направленными волокнами (Рис. 3.40А, Б, Г). Продольные пучки мышц располагаются вдоль всего ринофора вблизи нерва и спикул

(Рис. 3.38А; 3.39А, Б; 3.40Б). Часто можно обнаружить триаду, состоящую из пучка мышц, нерва и спикулы близко расположенных друг с другом (Рис. 3.29). В основании ринофора и под ним проходят мощные продольные мышцы – ретракторы кармана ринофора (Рис. 3.4Д). С одной стороны мышцы крепятся к основанию ринофора, с другой подходят к нижней части нотума. Вдоль отверстия кармана ринофора располагаются кольцевые мышцы, которые способствуют сокращению диаметра кармана и подтягиванию папилл ринофора друг к другу.

В центральной части ринофора *O. muricata* имеется хорошо развитая *лимфатическая полость* (Рис. 3.40А–В). Лимфатическая полость имеет небольшие ответвления и вдается в основание складок ринофора (Рис. 3.40В). Лимфатическая полость меняет свой объем в зависимости от состояния ринофора – расслаблен он или сокращен. В расслабленном ринофоре лимфатическая полость занимает значительный объем ринофора (Рис. 3.38Б; 3.39А, Б), в сокращенном – практически исчезает (Рис. 3.38Г, Д; 3.39, В, Г).

3.3.2 Механизм работы нормального ринофора

Витальные наблюдения за работой ринофора показали, что два ринофора *O. muricata* двигаются независимо друг от друга. Сокращение ринофора *O. muricata* происходит в два этапа: 1) происходит сокращение самого ринофора; 2) ринофор втягивается в карман ринофора.

Первая фаза – сокращение ринофора, не всегда заканчивается его втягиванием. Для полного цикла сокращения ринофора необходимо существенное воздействие извне. При сокращении самого ринофора он становится короче и толще, границы складок становятся практически не заметны, лимфатическая полость ринофора сокращается, спикульная сеть сжимается, расстояние между спикулами сокращается, спикулы складок ринофора сближаются со спикулами центральной части сети. Первая фаза сокращения ринофора осуществляется под действием мышц ретракторов ринофора.

Вторая фаза – втягивание ринофора в карман, происходит при полном сжатии самого ринофора за счет сокращения мышц ретракторов кармана. Ретракторы кармана крепятся к основанию ринофора с одной стороны, с другой – к границе кожно-мышечного мешка и нижней части нотума. Ринофор втягивается в карман, кольцевые мышцы кармана ринофора также сокращаются, отверстие кармана сужается, папиллы ринофора сближаются друг к другу.

Согласно визуальным наблюдениям, сокращение ринофора происходит крайне быстро, в то время как растяжение ринофора может занимать несколько минут. При расправлении из кармана, ринофор приобретает первоначальный вид. Складки расправляются, границы между ними отчетливо видны. Спиккулы ринофора возвращаются на свои места, ретракторы кармана и ретракторы ринофора расслабляются. «Разворачивание» ринофора происходит за счет нагнетания гемолимфы в лимфатический канал.

3.3.3 Подбор оптимальной модели регенерации

Одной из задач данной работы был подбор оптимальной модели для изучения процесса регенерации и выявление возможности формирования спиккул у половозрелых особей. Для этого нами были изучены четыре модели посттравматической регенерации: с удалением 1) апикальной части ринофора, 2) складчатой части ринофора, 3) ринофора целиком (с клавусом и рахисом), 4) папиллы в околожаберной области.

Результаты экспериментов показали, что при удалении апикальной части ринофора (верхушки и трех складок под ней) происходит восстановление только верхушки ринофора, новые складки ринофора и спиккулы в них не образуются (Рис. 3.41; 3.42). При удалении складчатой части ринофора – клавуса, и сохранении гладкого рахиса происходит восстановление нормальной структуры ринофора. Однако, в рахисе остаются интактные спиккулы, что может затруднять идентификацию новообразующихся структур (Рис. 3.43; 3.44). При удалении целого ринофора также происходит удаление всех интактных спиккул ринофора. Было отмечено, что при регенерации восстанавливается нормальная структура ринофора вместе со спиккулами. Эксперименты по регенерации папиллы в околожаберной области показали, что восстановление папиллы вовсе не происходит (Рис. 3.45), на месте повреждения наблюдается лишь эпителизация раны.

Таким образом оптимальной моделью для изучения спиккулогенеза является удаление ринофора целиком. Дальнейшее описание будет проводиться только для этой модели.

3.3.4 Регенерация ринофора

Первая реакция на повреждение ринофора сопровождается сближением двух папилл ринофора и механическим сжатием кармана ринофора и краев раны (Рис. 3.46).

В первые сутки после удаления ринофора видимых изменений на уровне световой микроскопии не обнаружено, рана остается закрыта папиллами ринофора. На ультраструктурном уровне наблюдаются многочисленные процессы клеточной деградации (Рис. 3.47А).

Спустя 24 часа (1 день после ампутации (дпа)) (Таблица 3.3) на месте ринофора формируется прозрачная выпуклая округлая регенерационная почка размером 120x150 мкм. Поверхность регенерационной почки сформирована раневым эпителием – уплощенными эпителиальными клетками, вытянутыми в продольном направлении (Рис. 3.48А). Раневой эпителий подстилают многочисленные клетки амебоидной формы с большим количеством гранул внутри. Под слоем клеток располагается пространство, заполненное лимфатической жидкостью.

На 2-3 дпа регенерат имеет округлую конусообразную форму (Рис. 3.48Б; 3.49А, Б). Внутренняя структура регенерационной почки имеет однородное содержимое из поперечно ориентированных волокон с небольшой полостью диаметром 20 мкм в центре (Рис. 3.48А, Б). В эпителии базальной части регенерата наблюдаются клетки с крупной вакуолью (Рис. 3.48Б). В некоторых участках регенерата между клетками имеются хорошо выраженные межклеточные пространства, клетки заполнены везикулами (Рис. 3.47Б). Однако при этом также наблюдаются активные процессы клеточного деления – митоза (Рис. 3.47В). Внутреннее содержимое ринофора на продольных срезах имеет вид многочисленных волокон, среди которых расположены разнообразные клеточные элементы (Рис. 3.49Б). Встречаются амебоидные клетки с выраженными подиями и гранулами округлой формы, клетки с отростками, несущими 1-2 крупные гранулы, клетки, имеющие вытянутую форму, мышечные клетки, а также небольшие округлые клетки с прозрачной вакуолью в центре, напоминающие склероциты.

На 4 дпа регенерат приобретает продолговатую коническую форму, увеличивается в размерах до 200 мкм (Рис. 3.49В; Таблица 3.3). В средней части регенерата встречаются вытянутые клетки с отростками и небольшими округлыми гранулами. В эпителии и полости ринофора также происходят деления клеток (Рис. 3.48В).

Спустя 5 дпа (Рис. 3.49Г; 3.50; Таблица 3.3) размер ринофора увеличивается незначительно – до 225 мкм. В субэпидермальном пространстве развивается внеклеточный матрикс в виде коллагеновых волокон, детектируются нормально развитые элементы нервной и мышечной системы (Рис. 3.50Б, В), также имеются клеточные элементы продолговатой формы с хорошо развитыми митохондриями и округлые амебоидные клетки с электронно-плотными гранулами (Рис. 3.50Д, Е, Ж). Помимо этого, как на просвет, так и на ультраструктурном уровне обнаружены спикеры регенерирующего ринофора (Рис.

3.49Г–Е; 3.50Г). Склероциты погружены в толщу коллагенового матрикса, плотность которого максимальна именно возле спикул (Рис. 3.50Г). Морфология склероцита регенерата аналогична морфологии склероцитов интактных ринофоров (Рис. 3.29). Внутри склероцита расположена крупная вакуоль, занимающая бóльший объем клетки. В отличие от внешней мембраны склероцита, мембрана вакуоли имеет участки с более выраженной осмиофильностью – темный осмиофильный слой в несколько раз толще мембраны склероцита (Рис. 3.50Г). Внутри вакуоли имеется аморфное содержимое (Рис. 3.50Г).

На 7 дпа регенерирующий ринофор вытянутой формы хорошо подвижен, способен к вытягиванию, но не сокращению (Рис. 3.48Г; 3.51А–Д; 3.52-3.54). В базальной части ринофора имеются хорошо развитые мышечные пучки, однако полость ринофора отсутствует (Рис. 3.52Б). При этом в кармане ринофора наблюдается деление клеток и наличие амeboидных клеток с длинными выростами, по морфологии напоминающие клетки, ограничивающие лимфатическую полость в интактном ринофоре. В эпителии регенерата наблюдаются процессы клеточного деления (Рис. 3.53А, Д, Е). В эпителии регенерата появляется большое количество Икс клеток, прилегающих к базальной мембране (Рис. 3.53А, Б, Д). В местах прилегания Икс клеток базальная мембрана формирует выпячивания в субэпидермальное пространство, а в местах свободных от них – сильно изрезанные участки (Рис. 3.53Г). Бóльшую часть объема Икс клетки занимает крупная вакуоль с мелкозернистым содержимым, мембрана вакуоли имеет хорошо выраженные осмиофильные участки. Клетки с подобным строением также встречаются в субэпидермальном пространстве (Рис. 3.53Б). Они погружены в толщу коллагенового матрикса, рядом с ними встречаются крупные амeboидные клетки с хорошо развитыми митохондриями и осмиофильными гранулами. В субэпидермальном пространстве также располагаются клеточные элементы различной морфологии: хорошо развитые нервные и мышечные клетки, склероцит и клетки, не характерные для интактного ринофора: амeboидные клетки с осмиофильными гранулами, вытянутые клетки с осмиофильными гранулами, клетки с длинными тонкими отростками (Рис. 3.52Г; 3.54Ж, И). На 7дпа на продольном срезе через центральную часть регенерирующего ринофора детектируется четыре слома спикул, диаметр которых 10-15 мкм (Рис. 3.51Б–Д). Спикулы расположены друг над другом. Тонкая морфология склероцитов 7дпа сходна со склероцитами 5 дпа (Рис. 3.52А). Осмиофильная обкладка мембраны вакуоли склероцита становится более выраженной, содержимое вакуоли увеличивается в размере, располагается слоями. На данной стадии наблюдается образование триад ринофора состоящая из элементов нервной и мышечной системы и склероцита (Рис. 3.52). Между элементами триады располагается внеклеточный коллагеновый матрикс, клеточных контактов обнаружено не было.

На 10 дпа наблюдается восстановление способности ринофора к сокращению, а также формируются складки ринофора толщиной 20-30 мкм и обособленная верхушка (Рис. 3.48Д; 3.55). На ультраструктурном уровне отмечено, что к десятому дню клетки с длинными выростами выстраиваются в ряд, соприкасаясь своими отростками и формируют стенку лимфатической полости (Рис. 3.56А). В эпителии регенерирующего ринофора также отмечены Икс клетки, вдающиеся глубоко в субэпидермальное пространство, том числе на длинных «шнурах» (Рис. 3.57В, Г). Изрезанность базальной мембраны в участках свободных от Икс клеток сохраняется (Рис. 3.57Е). В полости самого ринофора также как и в предыдущие дни встречаются различные клеточные элементы, а также продолжается пролиферация клеток (Рис. 3.56Б–Ж). Спиккулы локализованы в боковых частях ринофора друг над другом, напоминая их расположение в складках здорового ринофора (Рис. 3.51Ж; 3). Внутренняя структура спиккул рыхлая, рыхлая с полым центром (Рис. 3.51З). Особенности тонкой морфологии склероцитов разнообразнее, чем в предыдущие дни (Рис. 3.58). Встречаются как склероциты, участки мембраны вакуоли которых имеет большую осмиофильность (Рис. 3.58Г), так и склероциты, мембрана вакуоли которых по осмиофильности не отличается от мембраны склероцита (Рис. 3.58Б, В). Содержимое вакуоли склероцита может быть аморфным и располагаться с низкой плотностью по всей площади вакуоли склероцита (Рис. 3.58Б, Г), либо иметь вид концентрических слоев с разной осмиофильностью (Рис. 3.58В).

Хорошо выраженные врезающиеся бороздки появляются на 12-13 дпа под сформировавшимися складками ринофора (Рис. 3.48Е; 3.55В, Г; Табл. 3.3). Ранее сформировавшиеся складки увеличиваются в размерах почти до 40-50 мкм. Особенности морфологии эпителия, наличие различных клеточных элементов аналогично предыдущим дням регенерации (Рис. 3.59; 3.60). Количество спиккул увеличивается. Мембрана вакуоли склероцита всегда имеет участки повышенной осмиофильности (Рис. 3.61Г, Д, Е, З). Содержимое вакуоли электронно-прозрачное, аморфный компонент выражен слабо, а если выражен – занимает пристеночное положение, имеет вид тяжей (Рис. 3.61В, Г) или скопления в просвете вакуоли (Рис. 3.62А). Количество сформированных триад – нервы, мышцы, спиккулы, также увеличивается (Рис. 3.62).

Дальнейшее преобразование регенерата сопровождается увеличением количества складок ринофора. Регенерирующий ринофор имеет три складки на 15-17 дпа (Рис. 3.48Ж; 3.63), четыре – на 21-22 дпа (Рис. 3.48З; 3.64А, Б) к 25 дпа регенерат увеличивается в линейных размерах (Рис. 3.64В, Г) (Табл. 3.2). Также происходит увеличение количества спиккул (Рис. 3.48Ж; 3.63Б). Диаметр спиккул составляет 10-15 мкм, внутренняя структура спиккул смешанная: в центре имеется полость, заполненная монолитным содержимым, затем

следуют радиальные слои, а периферия спикул – монолитная (Рис. 3.63Б, Д). Спикулы располагаются друг над другом, однако более упорядоченно (Рис. 3.63Б, Д). Особенности тонкой морфологии аналогичны предыдущим дням (Рис. 3.64; 3.65; 3.66).

4 Обсуждение

Настоящая работа является первым комплексным исследованием преобразования покровов со спикульным комплексом голожаберных моллюсков в онтогенезе на примере *Onchidoris muricata*. Данные, полученные при изучении процессов регенерации, существенно дополнили представление о спикулогенезе и преобразовании спикульного комплекса на постличиночных этапах развития. Совокупность полученных данных позволяет проанализировать, как непосредственно процесс спикулогенеза, так и онтогенетическую динамику минерализации, роста и формирования биокompозитных структур на примере спикул. Также становится возможным обсудить гипотезы о гомологии спикул и других твердых скелетных структур моллюсков (раковин и наружных спикул).

4.1 Онтогенетическая динамика покровов

В настоящей работе впервые для голожаберных моллюсков на примере *O. muricata* одновременно прослежено онтогенетическое преобразование строения тела и спикульного комплекса на всех этапах постличиночного развития (Таблица 3.4). Подобно *Adalaria proxima* (Thompson, 1958) сразу после метаморфоза тело и ринофоры *O. muricata* гладкие, затем происходит формирование выростов тела – папилл и складок ринофоров (Рис. 3.2).

Спикульный комплекс. Формирование спикульного комплекса начинается в центральной части нотума, затем формирование спикул и трактов сопряжено с появлением папилл. Спикулы *O. muricata* в процессе онтогенеза преобразуются – короткие спикулы с тупыми концами растут, концы становятся заостренными (Рис. 3.2). Увеличение спикул в размерах в онтогенезе отмечено для представителей семейства Chromodorididae (Sánchez-Tocino et al., 2014), а также можно отметить для близкородственного *O. muricata* вида *Ad. proxima* (Thompson, 1958).

В теле *O. muricata* отмечены типы спикул присущие и другим доридам – одноосные, дуоосные, трехосные, четырехосные. Впервые показано, что внешняя морфология спикул ринофора отличается от спикул тела (Рис. 3.5). Следовательно, при описании спикульного состава дорид необходимо учитывать не только спикулы ноги, нотума и папилл, но и ринофоров.

В настоящей работе для *O. muricata* показано, что с увеличением размеров тела происходит и увеличение размеров спикул, расстояние между ними уменьшается, покровы становятся более плотными и жесткими. Несмотря на это, пластичность и гибкость тела

сохраняется. Подсчет спикул в центральной части тела у особей *O. muricata* на разных стадиях развития показал (Таблица 3.2), что количество спикул на участках тела пропорциональных размеру особей содержит приблизительно равное количество спикул, что свидетельствует об единовременном формировании спикул на ранних стадиях постэмбрионального развития. Далее в нормальном онтогенезе спикулы не формируются, а только растут, увеличиваются в размерах (Таблица 3.1).

В теле *O. muricata* спикулы располагаются не хаотично, а формируют оформленные скопления – тракты, совокупность трактов формирует спикульную сеть. У *O. muricata* выделены пять типов спикульных трактов: горизонтальный тракт ноги, горизонтальный тракт нотума, вертикальный тракт папилл. Впервые описаны звездчатый тракт в основании папилл и колодце-подобный – в ринофорах. Спикульная сеть нотума не поддается существующей классификации Пеннея и Касамессери (Penney, 2008; Kasamesiri et al., 2011). Спикульная сеть нотума наиболее похожа на решетчатую, однако, в отличие от нее, спикулы в горизонтальном тракте центральной части нотума не формируют решетку, а расположены параллельно друг другу, но перпендикулярно переднезадней оси тела. В крае нотума у *O. muricata* спикулы ориентированы перпендикулярно краю тела, в отличие от решетчатой сети, где также имеются и кольцевые тракты. Полученные результаты дополняют имеющиеся данные по строению спикульных сетей и могут быть в дальнейшем использованы для применения в качестве систематического признака дорид.

Для спикул *O. muricata*, в отличие от некоторых других дорид (Foale, Willan, 1987; Penney, 2006) показано отсутствие плотных контактов с мышцами (Рис. 3.11). Это может свидетельствовать о том, что изменение взаимного расположения спикул в теле при движении является пассивным, в результате изменения конформации того участка тела, где они расположены, и не связано с активной регуляцией положения спикул с помощью мышц.

Эпителий. В настоящей работе впервые прослежено онтогенетическое преобразование покровного эпителия голожаберных моллюсков на примере *O. muricata*. Существенное преобразование эпителия отмечено в нотуме и ринофорах, именно тех органах, которые изменяются при метаморфозе моллюска. Вероятно, именно отбрасывание раковины велигера при метаморфозе является сигналом к преобразованию ювенильного эпителия во взрослый, через стадии переходного эпителия (для нотума). При этом происходит увеличение количества эпителиальных желез и хитиновых веретен в эпителии ринофоров, что вероятно связано с их защитной функцией.

В результате исследований эпителия впервые были обнаружены особые Икс клетки (Рис. 3.13Б; 3.15Г; 3.17А, В; 3.18Б; 3.20Д; 3.21А, Г, Д; 3.22А). Отличительной особенностью

такой клетки является крупная вакуоль с мелкозернистым содержимым, которая занимает почти весь объем клетки. Содержимое Икс клеток напоминает содержимое вакуоли склероцитов в субэпидермальном пространстве на определенной стадии созревания спикул. Икс клетки были обнаружены во всех частях тела, содержащих спикулы (ноге, нотуме, папиллах, ринофорах). Икс клетки всегда плотно прилегают к базальной мембране и не выходят на поверхность эпителия, зато образуют многочисленные выпячивания в субэпидермальное пространство, причем у ранних ювенилей, спикулы которых находятся на стадии формирования, количество таких выпячиваний существенно превосходит их количество у взрослых особей. Ранее подобные клетки были отмечены лишь в ноге *O. muricata* (Skidmore, Rivera, 1982), но особого значения подобным структурам предано не было. Поскольку была показана явная динамика снижения количества Икс клеток и образуемых ими выпячиваний в субэпидермальное пространство с возрастом у *O. muricata*, а также отмечено сходство содержимого вакуолей Икс клеток и вакуолей склероцитов на стадии созревания, можно предположить, что Икс клетки участвуют в спикүлогенезе. И именно они являются эпителиальными предшественниками склероцитов, которые затем мигрируют в субэпидермальное пространство, где и формируются спикулы. Однако, стоит отметить, что терминальной стадии миграции Икс клеток – отшнуровывания от базальной мембраны эпителия в субэпидермальное пространство, достоверно отмечено не было.

Внеклеточный матрикс. Спикулы расположены под покровным эпителием и погружены в слой внеклеточного матрикса, основу которого составляют коллагеновые волокна, что показано методом иммуногистохимии (Рис. 3.24, 3.25). Плотность коллагенового матрикса, в который погружены спикулы, изменяется с преобразованием спикүльного комплекса. У ювенильных особей склероциты покрыты отдельными островками матрикса (Рис. 3.26А), которые затем разрастаются и у взрослых формируют единый плотный слой (Рис. 3.26Б, В).

На ранних стадиях созревания спикул рядом с ними наблюдаются несколько фибробластов, у взрослых – лишь их отростки в толще матрикса. Вероятно, синтез коллагеновых волокон ассоциирован с формированием спикул. Именно поэтому в зависимости от стадии формирования спикүльного комплекса наблюдается ассоциация фибробластов со склероцитами. Многократно в литературе обсуждалось важное значение внеклеточного матрикса, как формообразующего фактора для скелетных элементов (Wilt et al., 2013; Le Roy et al., 2014; Voigt et al., 2021). Не исключено, что у *O. muricata* именно внеклеточный матрикс ориентирует направление роста и определяет место спикулы в сложной упорядоченной архитектуре спикүльной сети.

Склероциты. Спиккулы *O. muricata* занимают субэпидермальное внутриклеточное положение, как и спиккулы других дорид (Thompson, 1958; Edmunds, 1966; 1968; Kress, 1981; Foale, Willan, 1987; Penney et al., 2020). Несмотря на то, что внутриклеточное положение спиккул показано сто лет назад, данные по особенностям морфологии спиккульных клеток в литературе отсутствуют. В настоящей работе впервые была изучена морфология склероцитов (Рис. 3.26А–В; 3.28). На примере *O. muricata* было прослежено, что спиккула занимает внутриклеточное положение на протяжении всей жизни моллюска. Одной спиккуле соответствует лишь один склероцит, который формирует ее (Рис. 3.3В). Полученные данные о морфологии склероцитов безраковинных моллюсков на примере *O. muricata* позволяют выделить спиккулы в отдельный тип несмотря на то, что среди беспозвоночных животных есть примеры внутриклеточного синтеза спиккул, например, у кораллов. Однако спиккулы кораллов после формирования оказываются во внеклеточном пространстве мезоглеи, поскольку спиккулогенная клетка разрушается (Рис. 1.3А) (Kingsley, 1984). Таким образом, внутриклеточное положение спиккулы в вакуоли склероцита на протяжении всей жизни является уникальной чертой дорид. В недавней работе с участием автора, на примере акохлидиды *Asperspina murmanica* показано, что склероциты акохлидид имеют общий план строения со склероцитами *O. muricata* (Mikhlina et al., 2024). Как уже было указано выше, экология групп гетеробранхий крайне отличается друг от друга. Acochlidiiomorpha, в отличие от Nudibranchia, являются мейобентосными миниатюрными животными. Вместе с тем, вероятно, особенности морфологии склероцитов присущи всем безраковинным гетеробранхиям. Полученные данные об онтогенетической динамике склероцитов *O. muricata* доказывают гипотезу об одновременной закладке спиккул на ранних стадиях постличиночного развития. На ранних этапах формирования все склероциты имеют хорошо развитое ядро и клеточные органеллы в перинуклеарной области (Рис. 3.28Б), а на поздних стадиях синтетический аппарат склероцита разрушается (Рис. 3.28Д, 3), некоторые клеточные органеллы подвергаются автолизу и процессам деградации, что может свидетельствовать о завершении синтеза спиккулы.

Внутренняя морфология спиккул. Изучение внутренней морфологии спиккул *O. muricata* позволило выявить несколько типов внутренней структуры (Рис. 3.30), которые так же были отмечены в литературе для других представителей голожаберных моллюсков, возраст и размер которых не был установлен.

Однако, благодаря изучению онтогенетической динамики спиккул *O. muricata*, в настоящей работе удалось установить, что внутренняя структура спиккул зависит от возраста моллюска. Для ювенилей *O. muricata* преимущественно характерны полые или рыхлые спиккулы (Рис. 3.30А, Б), которые затем преобразуется в смешанный тип (Рис.

3.30В–3), а у взрослых моллюсков – в монолитные (Рис. 3.30И). Помимо рыхлых и монолитных типов спикул отмечено большое количество смешанных типов строения, которые в основном характерны для неполовозрелых моллюсков, спикулы которых активно растут. Это может свидетельствовать о высокой скорости преобразования внутренней структуры спикул. Показано, что тип внутренней организации не зависит от формы спикул.

Такое изменение внутренней структуры спикул связано с их развитием – изменением химического состава, процессами роста и минерализации. Определение точного пути формирования спикул и преобразования их внутренней структуры является сложной задачей. Анализируя данные по морфологии спикул, их ультраструктуре, элементному анализу и экспериментам по кальцификации можно выстроить следующий ряд морфологических изменений, которые соответствуют стадиям их созревания (Рис. 4.1). Полые спикулы первой размерной группы являются только «оболочкой», какой-либо внутренний матрикс отсутствует, в спикулах второй размерной группы появляется внутренний коллагеновый матрикс – матрица для минерализации, соответственно в результате кальцификации получается концентрическая внутренняя структура, при большей минерализации – смешанный тип, у третьей размерной группы органическая матрица спикул полностью замещается минеральными компонентами, в результате чего получается монолитная внутренняя структура. Таким образом, минерализация происходит из центра спикулы к ее периферии, однако в некоторых случаях сохраняется аморфность центральной зоны спикул.

На примере кремниевых губок показано, что спикулогенез начинается с образования осевой нити (Voigt, 2021), вокруг которой затем располагаются концентрические кремниевые слои (Uriz et al. 2000, 2003). Предполагается, что осевая нить и мембрана, окружающая спикулы, являются элементами, определяющими форму спикул (Voigt, 2021). Между осевой нитью и внутренней стенкой спикулы образуются наносферы кремнезема. Осевые нити могут резорбироваться на более поздних стадиях формирования спикул (Uriz et al., 2003; Voigt et al., 2021).

Для морских ежей известно, что изначально спикулы состоят из аморфного карбоната кальция (АКК) (Beniash et al., 1997; Wilt, 2002). Лишь позже, на стадии личинки плютеуса, почти весь минерал превращается в кальцит. Это особенно интересно, поскольку АКК термодинамически не стабилен и, следовательно, эмбрион морского ежа должен иметь некоторый механизм стабилизации присутствия АКК. Другие беспозвоночные также используют АКК в качестве предшественников кристаллических фаз их минерализованных тканей.

В формировании спикул *O. muricata* удается отметить общие черты, как со спикулами стеклянных губок, так и морскими ежами. В спикулах *O. muricata* подобно губкам основание представлено органическим материалом, который минерализуясь приобретает концентрическую внутреннюю структуру, а после, в случае *O. muricata* становится монолитным, так и со спикулами морских ежей, которые состоят из аморфного карбоната кальция.

4.2 Органический и минеральный состав спикул

Химический состав. В настоящей работе выбран комплексный подход к изучению химического состава спикул на разных стадиях онтогенеза. Впервые для дорид были проанализированы органические составляющие спикул, так и минеральный компонент. Анализ органики был выполнен с помощью иммуногистохимического анализа и косвенных данных ТЭМ, а также метода ЭДС. Минеральный компонент проанализирован как на элементном уровне с помощью ЭДС, так и на уровне химических соединений с помощью Рамановской спектроскопии.

Органическая матрица. Органическая матрица играет важную роль в структурной организации минеральной структуры (Le Roy et al., 2014; Voigt et al., 2014, 2017, 2021). Как на сломах (Рис. 3.30), так и на срезах спикул *O. muricata* отмечен внутриклеточный матрикс, напоминающий поперечно срезанные коллагеновые волокна (Рис. 3.28Г; 3.29А). Действительно, в составе органической матрицы по данным иммуно-гистохимического анализа был выявлен коллаген (Рис. 3.25), что в целом соответствует гистологическим и ультраструктурным данным. На примере губок и иглокожих показано, что в состав органической матрицы входит огромное количество структурных белков, которые играют важную роль в определении полиморфы минерала, а также участвуют в процесс кальцификации как катализатор (Rahman, Oomori, 2008). Используемые методы в данной работе безусловно не являются достаточными для определения полного белкового состава органической матрицы спикул *O. muricata*. Вероятнее всего в ее состав помимо коллагена входят и другие белки, для определения которых необходимо использование комплекса дополнительных методов.

Анализ ЭДС позволяет качественно судить о наличии органических элементов и лишь косвенно о соотношении и распределении органических и минеральных компонентов в составе спикул. Благодаря использованию этого метода помимо углерода и кислорода в составе спикул был выявлен фосфор, распределение которого изменяется в зависимости от

стадии созревания спикул (Рис. 3.31–3.33). Наличие фосфора в спикулах может быть связано с содержанием фосфолированных белков в составе органической матрицы. Отмечено, что в рыхлых спикулах фосфор распределен равномерно по всей площади спикул (Рис. 3.31), что свидетельствует о высоком содержании органического компонента, который еще не минерализован. При изменении внутренней структуры спикул на смешанную, наиболее плотно фосфор распределен только по периферии в слоистой части спикулы (Рис. 3.32), при этом в монолитном центре его содержание минимально. Подобное распределение фосфора подтверждает гипотезу о минерализации спикул из центра к периферии. При этом в монолитных спикулах фосфор обнаружен тонким слоем по периферии спикулы, что свидетельствует о продолжении роста спикулы и наличии органической «оболочки» (Рис. 3.33). Таким образом, распределение фосфора, вероятно, является показателем органической матрицы спикул и стадии их минерализации.

Минеральный компонент. В настоящей работе впервые был применен комплексный подход для оценки химического состава спикул с помощью энерго-дисперсионной спектроскопии и Рамановской спектроскопии. Метод Рамановской спектроскопии является наиболее чувствительным к структурным и химическим изменениям, происходящим, когда ион магния (Mg^{2+}) заменяет ион кальция (Ca^{2+}) в кристаллической решетке кальцита, и отражает уменьшение межатомных расстояний после замещения ионов.

В составе спикул *O. muricata* установлено наличие кальцита и магниезального кальцита (Рис. 3.34). Наличие кальцита в спикулах голожаберных моллюсков предполагалось и ранее в литературе (Odum, 1951; Ehrlich, 2010; 2019), однако данные о наличии ватерита, флуорита, брусита и других соединений в них не подтвердились (Lowenstam, Weiner, 1983; Cattaneo-Vietti et al, 1995; Weiner et al, 2003; Kasamesiri et al., 2011). Подобная вариация состава опорных структур с чистого кальцита до магниезального ранее была отмечена для мшанок и иглокожих (Uriz et al., 2003; Wilt et al., 2013; Borromeo et al., 2017). В биогенных карбонатах магний часто замещает кальций в кристаллической решетке. Известно, что концентрация магния в них сильно зависит от температуры воды и состояния насыщения океана (Borromeo et al., 2017).

Изучение спикул с помощью элементно-дисперсной спектроскопии по словам позволяет лишь качественно судить о наличии элементов в составе спикул, а точную их массу и количество сказать затруднительно. Однако такой анализ позволяет оценить соотношения элементов на разных стадиях созревания. Согласно полученным данным наиболее вариабельным, является соотношение фосфора и кальция. В рыхлых спикулах фосфора бывает больше, чем кальция, либо их соотношение одинаково. Кальций в составе более зрелых спикул со смешанной и монолитной структурах существенно превосходит

фосфор. Однако стоит отметить, что магний в составе спикул всегда остается примерно на одном уровне и не изменяется в зависимости от стадии созревания. Известно, что помимо присутствия в кристаллической решетке, ионы магния также выполняют важную функцию – стабилизируют органическую матрицу спикул, что вероятно, применимо и для *O. muricata*.

Кальцификация спикул. Спикулы *O. muricata* кальцифицируются в процессе онтогенеза. Изучение кальцификации с использованием динатриевой соли флуорохрома кальцеина позволили выявить зоны минерализации спикул, которые расположены в концевых зонах спикул и по всей их поверхности (Рис. 3.35). Причем минерализация спикул ювенильных особей выражена значительно сильнее, чем у половозрелых особей, в спикулах которых кальцификация происходит лишь незначительно по поверхности спикул и не выражена в концевых зонах, что вероятно говорит о завершении роста спикул. Подобный тип минерализации в концевых зонах ранее обнаружен у *Neomeniomorpha* и морских ежей. Однако для последних отмечено, что механизм формирования спикул и их удлинения происходит с использованием разных механизмов.

4.3 Молекулярные механизмы минерализации. *In situ* гибридизация

В настоящей работе впервые проведена гибридизация *in situ* на голожаберных моллюсках на примере *Onchidoris muricata* для выявления зон экспрессии гена регуляторного белка из семейства карбоангидраз (Le Roy et al., 2014; Voigt et al., 2021). Поскольку карбоангидразы выполняют широкий спектр функций, изначально точную функцию экспрессируемых транскриптов предсказать было сложно, однако была предположена функция регуляции процесса минерализации кальцитовых спикул. Проведение гибридизации *in situ* с антисмысловыми зондами к гену карбоангидразы позволило отметить закономерность в зоне экспрессии гена и стадией формирования спикул (Рис. 3.36; 3.37). Экспрессия гена у разновозрастных моллюсков отмечена в разных зонах. Изначально у ранних ювенилей сигнал локализован в переходной зоне нотума и ноги (Рис. 3.36), затем начинает появляться в центральной части нотума, причем сигнал локализован внутриклеточно в склероцитах, как в перинуклеарной области, так и в вакуоли со спикулой (Рис.3.37). Вероятно, карбоангидраза принимает участие в минерализации спикул *O. muricata*. Однако для достоверного определения ее функции необходимы дополнительные исследования.

4.4 Регенерация

В данной работе были поставлены задачи по подбору оптимальной модели для изучения процесса регенерации и выявлению возможности формирования спикул у половозрелых особей. До настоящего времени регенерация голожаберных моллюсков практически не была изучена. Данные ограничивались восстановлением морфологии выростов тела у представителя Cladobranchia, в теле которых нет спикул (Kress, 1968, цит. по Короткова, 1997; Maroyan, 2021). Для Doridina данных по регенерации частей тела со спикулами не было. На примере двух видов Cladobranchia показана способность к регенерации папилл и ринофоров (Edmunds, 1966; Kress, 1968, цит. по Короткова, 1997; Miller, Byrne, 2005). Имеющиеся данные позволили предположить аналогичную регенерационную способность и у близкородственных дорид, в теле которых имеются спикулы. На примере *O. muricata* нами было отмечено, что ринофоры и папиллы обладают разными регенеративными возможностями. При удалении папилл *O. muricata* происходит лишь эпителизация раны, но не восстановление морфологии (Рис. 3.45), в то время как регенерация ринофоров после удаления происходит, причем различается в зависимости от степени повреждения органа (Рис. 3.41; 3.46), что обсуждено ниже.

Наблюдаемые различия в регенерации ринофоров и папилл могут быть связаны с функциональной нагрузкой органов. Ринофоры в обеих группах голожаберных моллюсков (Cladobranchia и Doridina) выполняют важную хемосенсорную функцию. Папиллы в группе Cladobranchia выполняют пищеварительную функцию, несут протоки пищеварительной железы, в то время как папиллы дорид выполняют защитную функцию и содержат внутри секреторные железы и спикулы. У *O. muricata* в ринофоре имеется крупный нерв ринофора, который иннервируется от ринофорального ганглия, который сохраняется при повреждении самого ринофора, в то время как папиллы содержат лишь небольшое количество нервных элементов внутри, что может влиять на отсутствие регенерационной возможности. В литературе неоднократно отмечено важное влияние нервной системы на регенерацию не только ее составляющих, но и на регенерацию других органов и даже систем органов (Chase, Kamil, 1983; Gorbushin et al., 2001; Tuchina, Meyer-Rochow, 2010; Maroyan, 2021). Нервные клетки представляют собой важный элемент клеточной ниши. На ранних этапах регенерации показано, что образование бластемы зависит от наличия остаточной нервной ткани, а денервация приводит к недостаточной индукции бластемы (Cannata et al., 2001; Endo et al., 2004; Mitogawa et al., 2014).

Регенерация ринофоров является удобной моделью для изучения спикулогенеза, поскольку спикулы ринофоров хорошо отличимы от спикул других отделов тела (Рис. 3.5).

В настоящей работе было проведено сравнение процессов восстановления ринофора при разной интенсивности повреждения – при полном (Рис. 3.46) и частичном удалении ринофора (Рис. 3.41). Оказалось, что при удалении лишь трех складок ринофора восстановление его архитектуры не происходит, что вероятно связано с сохранением функциональности органа (Рис. 3.42-3.44). При удалении складчатой части ринофора или ринофора целиком происходит полная регенерация. Наиболее удобной моделью для изучения спиккулогенеза во время посттравматической регенерации была выбрана операция по полному удалению ринофора, поскольку при этом из эксперимента полностью удаляются интактные спиккулы ринофора. Ультраструктурные исследования процессов регенерации существенно дополнили представления как о восстановлении самой структуры ринофора, так и о спиккулогенезе.

Несмотря на высокую изменчивость и вариабельность способов регенерации у многоклеточных животных, в репаративной регенерации сложных структур можно выделить три этапа: 1) закрытие раны путем образования регенерационного эпителия и общая реакция организма на травму; 2) индукция регенерации, обычно путем привлечения предшественников и образование бластемы; 3) морфогенез, включающий формирование, дифференцировку и рост поврежденного органа (Tiozzo, Copley, 2015; Videau et al., 2021). Последовательность регенерации ринофоров *O. muricata* соответствует отмеченным этапам. Сразу после повреждения наблюдается мышечное сокращение стенок кармана ринофора. Сжатие раны обеспечивается за счет мощных кольцевых мышц, окружающих карман ринофора. Помимо первой реакции на повреждение в виде сокращения мышц, на клеточном уровне также наблюдается ответ в виде деградации поврежденных клеток (Рис. 3.46А). О важности процессов клеточной гибели также сообщалось и ранее при изучении регенерации других беспозвоночных (Bergmann, Steller, 2010; Guimond et al., 2010; Pellettieri et al., 2010). Вероятно, именно процессы клеточной смерти в совокупности с другими факторами инициируют процесс регенерации органов, запускают перестройку тканей.

На ранних стадиях регенерации ринофора у *O. muricata* происходит образование раневого эпителия, который, собственно, и затягивает края раны. Однако клеточных делений в эпителии в это время выявить не удалось, из чего можно предположить, что пул клеток для реэпителизации раны формируется за счет перестройки других клеток регенерата или его окружения.

Уже в первый день после ампутации (дпа) ринофора можно наблюдать появление клеток амебоидной формы у места ранения. Обнаружены амебоидные клетки нескольких типов (Рис. 3.48А): 1) клетки с большим количеством крупных гранул в цитоплазме, которые окрашиваются в синий цвет метиленовым синим, 2) клетки, цитоплазма которых

несет 1-2 крупные гранулы, которые не окрашиваются метиленовым синим; а также 3) клетки, в цитоплазме которых отсутствуют какие-либо гранулы. Однако точное количество морфотипов клеток установить затруднительно.

Во второй день регенерации в просвете регенерата также наблюдаются амeboидные клетки, формирование внеклеточного матрикса. Вероятно, какие-то из вышеперечисленных амeboидных клеток синтезируют внеклеточный матрикс в окружающую среду. На третий день регенерации межклеточный матрикс приобретает вид волокон и формирует раневую пробку (Рис. 3.48Б). Однако уже на 4 дпа в просвете регенерирующего ринофора такой плотности внеклеточного матрикса не наблюдается (Рис. 3.48В). На 4 дпа клеточные элементы представлены многочисленными амeboидными клетками с длинными отростками, а амeboидные клетки с гранулами в цитоплазме, которые были обнаружены ранее, не встречаются. Можно предложить, что именно эти амeboидные клетки с гранулами участвуют в синтезе матрикса, а затем морфология этих клеток преобразуется. Однако достоверно определить, являются ли эти клетки вновь появившимися или другой стадией развития клеточных элементов, которые наблюдались ранее, невозможно. На этой стадии происходит активная пролиферация клеток как в полости регенерата, так и в эпителии (Рис. 3.48В). Морфология эпителия регенерата на 5 дпа отличается от эпителия интактного ринофора и больше напоминает эпителий ранних ювенильных стадий *O. muricata* или вовсе велигеров *Rostanga pulchra* MacFarland, 1905 (Chia, Koss, 1982). Однако в эпителии уже появляются первые Икс клетки у базальной мембраны, формирующие эвагинации в субэпидермальное пространство.

Регенерат увеличивается в размере, приобретает вытянутую коническую форму. Регенерация гомологичных ринофорам головных и глазных щупалец (у Caenogastropoda, низших гетеробранхий и Planpulmonata, соответственно) происходит подобным образом (Staubach, Klussmann-Kolb, 2007).

Одновременно с этим происходит восстановление элементов нервной системы ринофора. На поверхности регенерирующего ринофора начинается формирование сенсорных областей в виде отдельных островков ресничек. Подобный паттерн расположения сенсорных ресничек наблюдается у велигеров *R. pulchra* (Chia, Koss, 1982). Таким образом, подобное расположение островков ресничек в регенерате и у велигеров позволяет предположить, что так происходит восстановление чувствительности регенерата, повторяя путь нормального развития.

На 5 дпа в регенерате наблюдаются элементы нервной и мышечной систем, первая спикула, а также многочисленные амeboидные клетки. Первая спикула имеет диаметр 4 мкм – меньше, чем спикулы интактного ринофора. Склероцит регенерирующего ринофора

имеет стандартное строение: тело клетки несет ядро и клеточные органеллы, вакуоль со спикулой занимает больший объем клетки. В отличие от вакуоли интактного склероцита, мембрана вакуоли склероцита регенерирующего ринофора имеет выраженные осмиофильные участки, подобно осмиофильной обкладке вакуоли Икс клеток. Данное сходство позволяет предположить связь Икс клеток в эпителии со склероцитами в субэпидермальном пространстве. В вакуоле спикулы регенерата имеется внутриклеточное содержимое в виде тонких волокон.

При формировании гладкого стебелька – рахиса ринофора, на 7 дпа он становится подвижен, способен к втягиванию в карман ринофора, что свидетельствует о восстановлении элементов нервной и мышечной систем регенерирующего ринофора. При этом сокращение самого регенерата не происходит, т.к. лимфатическая полость еще не обособлена. Это объясняется принципом работы интактного ринофора. Начиная с этой стадии дальнейшие изменения связаны с восстановлением метамерности ринофора – увеличением размера регенерата, количества спикул и формированием складок. Перед формированием складки происходит обособление верхушки и формирование спикулы регенерата. Именно спикулы определяют место формирования врезающейся борозды, будущей складки ринофора. Каждая последующая складка также ассоциирована со спикулой ринофора и формируется на границе гладкого рахиса и клавуса, интеркалярно. Морфология эпителия регенерата преобразуется и напоминает эпителий уже не ранних ювенилей, а неполовозрелых особей. В апикальной части эпителиальных клеток появляются вакуоли с хитиновыми веретенами, у базальной мембраны формируется большое количество Икс клеток с гранулированным содержимым. Базальная мембрана эпителиальных клеток в некоторых местах сильно изрезана. В регенерате продолжают наблюдаться активные процессы клеточного деления.

Важным этапом в формировании архитектуры нормального ринофора является восстановление триад, состоящих из мышц, нервов и склероцитов, окруженных внеклеточным матриксом. Однако какую функциональную нагрузку несет такая ассоциация остается не понятно. Морфология новых спикул регенератов сильно отличается от спикул интактного ринофора. Диаметр и размер спикул в регенератах меньше, чем в здоровом ринофоре, а внутренняя структура более рыхлая (Рис. 3.50Б–Д). Спикулы регенерата всегда имеют внутриклеточный матрикс, что свидетельствует о ранней стадии созревания. В отличие от зрелых спикул ринофора, в спикулах регенерата присутствуют осмиофильные участки мембраны вакуоли. В полости регенерата продолжают детектироваться многочисленные клетки с отростками и гранулами.

На 10 дпа в базальной части ринофора клетки выстраиваются в ряд, соединяются клеточными выростами, ограничивая лимфатическую полость (Рис. 3.56А). На этой же стадии восстанавливается способность ринофора к сокращению, что доказывает важную роль лимфатической полости в работе ринофора. В полости ринофора появляются клетки, напоминающие ранее описанные дедифференцирующиеся миобластоподобные клетки у *Owenia fusiformis* (Delle Chiaje, 1844) (Oweniida, Annelida) (Рис. 3.56Ж), которые затем редифференцируются в новые мышечные клетки (Fontes et al., 1983). Можно предположить, что в теле *O. muricata* подобные клетки выполняют аналогичную функцию и мышечные клетки также дедифференцируются. В эпителии продолжают наблюдаться активные процессы деления. По-видимому, именно пролиферация этих клеток является единственным источником новых эпидермальных клеток. В эпителии регенерата появляется все большее количество Икс клеток, которые формируют эвагинации в субэпидермальное пространство, в том числе на длинных мембранных тяжах. В некоторых случаях отмечены тонкие перемычки на границе эвагинации, что косвенно может говорить о процессе миграции Икс клеток в субэпидермальное пространство. Причем вакуоль Икс клеток имеют такую же осмиофильную обкладку, как и вакуоль у вновь формирующихся склероцитов. А внутреннее содержимое некоторых склероцитов, вероятно, которые только сформированы, аналогично содержимому вакуолей Икс клеток. Подобные наблюдения позволяют сделать вывод о том, что именно эти эпителиальные Икс клетки дают начало вновь формирующимся спикулам в регенерате и играют важную роль в спикулогенезе *O. muricata*.

На более поздних стадиях регенерации увеличивается количество спикул, их размер и диаметр. Разнообразие внутренней морфологии спикул и ультраструктуры склероцитов так же возрастает, что свидетельствует о преобразовании склероцитов, об их созревании. Как было отмечено выше, образование спикул инициирует образование складок ринофора и восстановление его внешней архитектуры. В течении 25 дней восстанавливаются четыре обособленные складки ринофора. Вероятно, восстановления количества складок, как в интактном ринофоре (7-9 складок) не наблюдали в связи с продолжительностью эксперимента. На 25 дпа в регенерате продолжают наблюдаться процессы деления, что свидетельствует о продолжении восстановления нормальной морфологии ринофора.

В данной работе была подобрана оптимальная модель для изучения регенерации на примере спикульных дорид. При этом были показаны различные регенерационные потенции разных органов – ринофоров и папилл. Впервые проведенные эксперименты по регенерации позволили выявить формирование спикул *de novo*.

В результате сравнительного анализа онтогенетической динамики эпителия, преобразования склероцитов на разных стадиях развития, а также особенностей регенерации на ультратонком уровне, впервые удалось выявить вероятных предшественников спикул – Икс клетки (Рис. 4.2). Икс клетки имеют эпителиальное происхождение, формируют эвагинации в субэпидермальное пространство (Рис. 4.2Б–Д), куда вероятно мигрируют путем перетяжки после формирования мембранного тяжа (Рис. 4.2Е, Ж). Далее в субэпидермальном пространстве в их вакуоли растут и минерализуются спикулы (Рис. 4.23). Следовательно, Икс клетки в покровном эпителии, вероятно, являются склероцитами на ранней стадии развития.

Полученные данные подтверждают гипотезу об эктодермальном происхождении спикул голожаберных моллюсков. Таким образом, принцип формирования всех опорных твердых структур моллюсков осуществляется по единому принципу – эктодермальным эпителием.

5 Заключение

Настоящая работа является первым комплексным исследованием спикул и особенностей спикүлогенеза на разных стадиях онтогенеза и репаративной регенерации голожаберных моллюсков на примере *Onchidoris muricata*.

В результате исследований были получены данные по преобразованию покровов в онтогенезе, включая эпителий, внеклеточный матрикс и спикульный слой. Впервые прослежены изменение химического состава спикул (как органического, так и минерального), их рост и процесс минерализации на постличиночных этапах развития в онтогенезе, процесс регенерации и формирование спикул *de novo* в результате посттравматической регенерации.

Комплексный подход к изучению онтогенетической динамики и восстановлению спикульного комплекса, включающий весь спектр морфологических и молекулярных методов, в том числе метод гибридизации *in situ*, впервые позволил сформулировать гипотезу о способе формирования и минерализации кальцитовых спикул у голожаберных моллюсков.

В результате работы были выявлены вероятные клетки – предшественники спикул в покровном эпителии – специализированные Икс клетки. Икс клетки расположены в базальной части вседостратифицированного покровного эпителия и формируют многочисленные эвагинации в субэпидермальное пространство на стадиях онтогенеза, на которых происходит активный спикүлогенез. Икс клетки под эпителием остаются окружены базальной мембраной, однако расположены на длинных мембранных тяжах. Предложена гипотеза о миграции Икс клеток в субэпидермальное пространство и потери связи с эпителием с помощью перетяжки. В субэпидермальном пространстве Икс клетки преобразуются в типичные склероциты. Внутриклеточно в вакуоли склероцита в течении всей жизни располагается спикула, которая никогда не выходит в экстраклеточное пространство. Спикулы имеют органическую матрицу, состоящую вероятнее всего из смеси белков, из которых достоверно удалось определить коллаген. На ранних этапах внутри спикул детектировано большое количество фосфора, что свидетельствует о гликозилировании белков в составе матрицы. Помимо фосфора также показано значительное количество кальция и магния в составе спикул. Спикулы *O. muricata* состоят из кальцита и магниального кальцита. Внутренняя структура спикул изменяется в процессе минерализации. У *O. muricata* детектировано шесть типов внутреннего строения спикул, причем для ювенилей преимущественно характерны полые или рыхлые спикулы,

которые затем преобразуются в смешанный тип, а для взрослых моллюсков – монолитный. В настоящей работе предложен вероятный путь преобразования внутренней структуры спикул. В полых спикулах на ранних ювенильных стадиях отсутствует какое-либо содержимое. У ювенилей в склероцитах наблюдается внутриклеточный коллагеновый матрикс, который выполняет роль матрицы минерализации. В результате кальцификации формируется концентрическая внутренняя структура, которая сменяется смешанной. У взрослых *O. muricata* спикулы минерализуются, в результате чего получается монолитная внутренняя структура. Преобладание определенных типов внутренней структуры у моллюсков одного возраста свидетельствует в пользу гипотезы о единовременном формировании пула склероцитов. Наличие нескольких типов смешанной внутренней структуры – с рыхлым центром и концентрическими слоями по периферии, с полым центром и концентрическими слоями, с рыхлым центром и радиальными слоями, рыхлым центром и как радиальными, так и концентрическими слоями, может свидетельствовать о наличии нескольких путей минерализации – через образование радиальной или концентрической структуры. Вероятно, конкретный путь может зависеть от комплекса факторов, в том числе от изначальной конформации органической матрицы минерализации спикулы.

Помимо минерализации спикулы в процессе онтогенеза растут. Определены зоны роста спикул – в их концевых участках и по всей периферии спикул. Процесс роста спикул наиболее выражен у ювенилей *O. muricata*, в то время как у взрослых особей рост спикул заканчивается.

В настоящей работе выявлены вероятные регуляторные белки минерализации *O. muricata* разных возрастов – карбоангидразы. Проведение гибридизации *in situ* и визуализация зон экспрессии карбоангидразы позволили выявить пул формирования спикул в переходной зоне ноге и нотума у ранних ювенилей после метаморфоза. У *O. muricata*, спикулы которых растут и созревают, экспрессия карбоангидразы обнаружена внутриклеточно в цитоплазме склероцитов. У взрослых особей экспрессия карбоангидразы не выражена, что может свидетельствовать об окончании процессов минерализации.

Эксперименты по регенерации ринофоров и папилл *O. muricata* показали различия в их способности к регенерации, что вероятно связано с различной функцией и иннервацией органов. После удаления ринофоры восстанавливают свою нативную структуру, в то время как папиллы – нет. Дедифференцированные клетки регенерата вероятно являются основой для реэпителизации раны. Последующие изменения связаны с формированием регенерационной почки и миграцией пула амeboидных клеток к месту повреждения.

Вероятно, именно эти амебоидные клетки формируют раневую пробку из внеклеточного матрикса. Восстановление эпителия регенерата повторяет изменения эпителия в онтогенезе. Начиная с 5 дня эксперимента в регенератах детектируются первые спикулы, которые обладают меньшими размерами и рыхлой внутренней структурой, подобно ювенильным спикулам в нормальном онтогенезе. Вероятно, в образовании новых спикул участвуют Икс клетки эпителия, как и в нормальном развитии. Таким образом, спикулы регенератов имеют эктодермальное происхождение и формируются *de novo*. Морфология склероцитов регенерата аналогична морфологии склероцитов интактного ринофора. Внутри склероцита расположена крупная вакуоль, занимающая бóльший объем клетки. В отличие от внешней мембраны склероцита, мембрана вакуоли имеет участки с более выраженной осмиофильностью, как в вакуоли Икс клеток. За время эксперимента наблюдаются процессы роста и созревания спикул. Вновь образованные спикулы определяют место для формирования врезающейся борозды и будущей складки ринофора.

Помимо описания морфологии и преобразования покровов, в том числе спикул *O. muricata* в процессе нормального онтогенеза и репаративной регенерации, полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезу об эктодермальном происхождении субэпидермальных внутриклеточных спикул *O. muricata*, подобно другим опорным структурам моллюсков и армированным структурам всех трохофорных животных. Результаты проведения *in situ* гибридизации позволяют предположить функциональную конвергенцию карбоангидраз беспозвоночных животных. Результаты настоящей работы могут послужить фундаментом для будущих исследований в области биологии развития, биоминерализации, биотехнологий и материаловедения.

6 Выводы

На основании данных, полученных впервые в процессе изучения морфологии спикульного комплекса и отдельных спикул в онтогенезе *Onchidoris muricata* и в процессе репаративной регенерации с применением комплекса методов, были сформулированы следующие выводы.

- 1) Закладка спикул *O. muricata* происходит одновременно и пространственно закономерно в виде спикульных трактов на ранней стадии постличиночного развития. В дальнейшем онтогенезе спикулы увеличиваются только в линейных размерах, а их количество остается неизменным.
- 2) Спикулы *O. muricata* формируются на основе органического матрикса, кальцифицируются и приобретают монолитную структуру у взрослых особей, проходя промежуточные этапы минерализации, характеризующиеся смешанной (концентрической и радиальной) структурой спикул.
- 3) Спикулы *O. muricata* располагаются под покровным эпителием внутриклеточно в вакуолях специализированных клеток — склероцитов, на протяжении всего онтогенеза.
- 4) Предшественниками субэпидермальных склероцитов *O. muricata* являются специализированные клетки эктодермального эпителия – Икс клетки, которые погружаются под покровный эпителий в соединительно-тканый слой на ранних стадиях развития.
- 5) Спикулы *O. muricata* состоят из кальцита и магниезиального кальцита.
- 6) Выявленные с помощью метода *in situ* гибридизации зоны экспрессии карбоангидразы в склероцитах на разных стадиях онтогенеза *O. muricata*, позволяют предположить ее участие в процессе минерализации спикул.
- 7) Спикулы *O. muricata* формируются *de novo* при посттравматической регенерации ринофоров, соответствуя нормальному спикулогенезу. Регенерация папилл не происходит.

7 Список цитируемой литературы

1. Короткова Г.П. Регенерация животных. Изд-во С.-Петербур. ун-та, 1997. С. 302-333.
2. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине: методическое руководство. – СПб.: Наука, 1994. – 400 с.
3. Сидельников А.П. Регенерация оптического щупальца у гигантской африканской улитки *Achatina fulica*. – Изв. РАН Сер. биол., 1991. – Т. 5. – С. 716-725.
4. Abolins-Krogis A. The morphological and chemical characteristics of organic crystals in the regenerating shell of *Helix pomatia* L. // *Acta Zool.*, 1958. – V. 39. – P. 19-40.
5. Addadi L., Weiner S. Biomineralization: mineral formation by organisms // *Phys. Scr.*, 2014. –V. 89., № 9. –P. 098003.
6. Alder J., Hancock A. A monograph of the british nudibranchiate mollusca with figures of all the species. – Ray society, 1845
7. Arnold S., Plate U., Wiesmann H. P., Stratman U., Kohl H., Höhling H. J. Quantitative analyses of the biomineralization of different hard tissues // *Journal of Microscopy.* – 2001. –V. 202. – № 3. – P. 488-494.
8. Avila C., Durfort M. Histology of epithelia and mantle glands of selected species of doridacean molluscs with chemical defensive strategies // *The Veliger.* – 1996. – V. 39. – P. 148- 163.
9. Beedham G.E. Observations on the mantle of the Lamellibranchia // *J. Cell Sci.* – 1958. – V. 46. – P. 181-197.
10. Beniash E., Aizenberg J., Addadi L., Weiner S. Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.* – 1997. –V. 264. – №1380. – P. 461-465.
11. Beniash E., Addadi L., Weiner S. Cellular control over spicule formation in sea urchin embryos: a structural approach // *Journal of structural biology.* – 1999.– V. 125 – № 1. – P. 50-62.
12. Bereiter-Hahn J., Matoltsy A. G., Richards K. S. (Eds.). *Biology of the integument: Invertebrates.* Springer Science & Business Media. 2012
13. Bergmann A., Steller H. Apoptosis, stem cells, and tissue regeneration // *Science signaling.* – 2010. – V. 3. – № 145. – P. 1-8.
14. Bickell L. R., Chia F. S. Organogenesis and histogenesis in the planktotrophic veliger of *Doridella steinbergae* (Opisthobranchia: Nudibranchia) // *Marine Biology.* – 1979.– V. 52. – P. 291-313.
15. Bideau L., Kerner P., Hui J., Vervoort M., Gazave E. Animal regeneration in the era of transcriptomics // *Cellular and Molecular Life Science.* – 2021. – V. 78. – № 8.– P. 3941-3956.

16. Borromeo L., Zimmermann U., Andò S., Coletti G., Bersani D., Basso D., Gentile P., Schulz B., Garzanti E. Raman spectroscopy as a tool for magnesium estimation in Mg-calcite // *Journal of Raman Spectroscopy*. – 2017. – V. 48. – № 7. – P. 983-992.
17. Brenzinger B., Haszprunar G., Schrödl M. At the limits of a successful body plan - 3D microanatomy, histology and evolution of *Helminthope* (Mollusca: Heterobranchia: Rhodopemorpha), the most worm-like gastropod // *Front. Zool.* 2013. V. 10. P. 37.
18. Cannata S. M., Bagni C., Bernardini S., Christen B., Filoni S. Nerve-independence of limb regeneration in larval *Xenopus laevis* is correlated to the level of fgf-2 mRNA expression in limb tissues // *Developmental biology*. – 2001. – V. 231. – № 2. – P. 436-446.
19. Carter J. G., Aller R. C. Calcification in the bivalve periostracum // *Lethaia*. – 1975. – V. 8. – № 4. – P. 315-320.
20. Carballo J.L., Cruz-Barraza J.A. A revision of the genus *Mycale* (Poecilosclerida: Mycalidae) from the Mexican Pacific Ocean // *Contributions to Zoology*. – 2010. – V. 79. – № 4. – P. 165-191.
21. Cattaneo-Vietti R., Angelini S., Gaggero L., Lucchetti G. Mineral composition of nudibranch spicules // *J. Molluscan Stud.* – 1995. – V. 61. – P. 331-337.
22. Chang Y.-W., Willan R., Mok H.K. Can the morphology of the integumentary spicules be used to distinguish genera and species of phyllidiid nudibranchs (Porostomata: Phyllidiidae)? // *Molluscan Res.* – 2013. – V. 33. – P. 14-23.
23. Chase R., Kamil R.A. 1983. Morphology and odor sensitivity of regenerated snail tentacles // *Journal of Neurobiology*. – V. 14 – № 1. – P. 43-50.
24. Chia F.S., Koss R. Fine structure of the larval rhinophores of the nudibranch, *Rostanga pulchra*, with emphasis on the sensory receptor cells // *Cell Tissue Res.* – 1982. – V. 225. – P. 35-48.
25. Croce G., Frache A., Milanesio M., Marchese L., Causa M., Viterbo D., Barbaglia A., Bolis V., Bavestrello G., Cerrano C., Benatti U. Structural characterization of siliceous spicules from marine sponges // *Biophysical Journal*. – 2004. – V. 86. – № 1. – P. 526-534.
26. Dragesco J. *Ciliés mésopsammiques littoraux: systématique, morphologie, écologie*. FeniXX. (1960).
27. Graham A. The molluscan skin with special reference to prosobranchs // *J. Molluscan Stud.* 1957. – V. 32. – P. 135-144.
28. Davies M.S., Hawkins S.J. Mucus from marine molluscs // *Advances in marine biology*. – 1998. – V. 34. – P. 1-71.
29. Dubois P., Ameye L. Regeneration of spines and pedicellariae in echinoderms: a review // *Microscopy research and technique*. – 2001. – V. 55. – № 6. – P. 427-437.

30. Eder B., Schroedl M., Jörger K. M. Systematics and redescription of the European meiofaunal slug *Microhedyle glandulifera* (Kowalevsky, 1901) (Heterobranchia: Acochlidia): evidence from molecules and morphology // *Journal of Molluscan Studies*. – 2011. – V. 77. – № 4. – P. 388-400.
31. Edmunds M. Protective mechanisms in the Eolidacea (Mollusca Nudibranchia) // *J. Linn. Soc.* – 1966. – V. 47. – P. 27-70.
32. Edmunds M. "Acid secretion in some species of Doridacea (Mollusca, Nudibranchia) // *Journal of Molluscan Studies*. – 1968. – V. 38. – № 2. – P. 121-133.
33. Ehrlich H. "Molluscs spicules." *Biological Materials of Marine Origin*. 2010.
34. Ehrlich H., (2019). Spicular structures in Molluscs. *Marine Biological Materials of Invertebrate Origin*, 133-157.
35. Ekimova I. A., Grishina D. Y., Nikitenko E. D. Nudibranch molluscs of Sakhalin Island, Northwestern Pacific: new records and descriptions of two new species // *Ruthenica, Russian Malacological Journal*. – 2024a. – V. 34. – № 2. – P. 69-91.
36. Ekimova I. A., Nikitenko E. D., Stanovova M. V., Schepetov D. M., Antokhina T. I., Valdés Á. Integrative taxonomy and phylogeography of the genus *Acanthodoris* (Gastropoda: Nudibranchia) in the Russian seas, with the description of a new genus // *Zoosystematica Rossica*. – 2024b. – V. 33. – № 2. – P. 244-273.
37. Emler R. B. Echinoderm calcite: a mechanical analysis from larval spicules // *The Biological Bulletin*. – 1982. – V. 163. – № 2. – P. 264-275.
38. Endo T., Bryant S. V., Gardiner D. M. A stepwise model system for limb regeneration // *Developmental biology*. – 2004. – V. 270. – № 1. – P. 135-145.
39. Flores R. L., Livingston B. T. The skeletal proteome of the sea star *Patiria miniata* and evolution of biomineralization in echinoderms // *BMC evolutionary biology*. – 2017. – V. 17. – P. 1-14.
40. Foale S.J., Willan R.C. Scanning and transmission electron microscope study of specialized mantle structures in dorid nudibranchs (Gastropoda: Opisthobranchia: Anthobranchia) // *Mar. Biol.* – 1987. – V. 95. – P. 547-557.
41. Fontes M., Coulon J., Delgross M. H., Thouveny Y. Muscle dedifferentiation and contractile protein synthesis during post-traumatic regeneration by *Owenia fusiformis* (polychaete annelid) // *Cell differentiation*. – 1983. – V. 13. – № 4. – P. 267-282.
42. Frey E. Recherches chimiques sur les os // *Annls. Chim. Phys.* – 1855. – V. 43. – P. 47-107.

43. Furuhashi T., Schwarzinger C., Miksik I., Smrz M., Beran A. Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis // *Comp. Biochem. Physiol.* – 2009. – V. 154. – P. 351-371.
44. Gilbert P.U., Wilt, F.H. (2011). Molecular aspects of biomineralization of the echinoderm endoskeleton. In *Molecular Biomineralization: Aquatic Organisms Forming Extraordinary Materials* (P. 199-223). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
45. Giribet G., Edgecombe G.D. The invertebrate tree of life // Princeton University Press. 2020.
46. Grillo M. C., Goldberg W. M., Allemand D. Skeleton and sclerite formation in the precious red coral *Corallium rubrum* // *Marine Biology.* – 1993. – V. 117. – P. 119-128.
47. Goddard J.H. Ametamorphic direct development in *Dendrodoris behrensi* (Nudibranchia: Dendrodorididae), with a review of developmental mode in the family // *Proceedings of the California Academy of Sciences (Fourth Series).* – 2005. – V. 56. – № 19. – P. 201-211.
48. Goddard J.H., Green B. Developmental mode in opisthobranch molluscs from the northeast Pacific Ocean: additional species from southern California and supplemental data // *Bulletin, Southern California Academy of Sciences* – 2013. – V. 112. – № 2. – P. 49-62.
49. Goodheart J.A., Bely A.E. Sequestration of nematocysts by divergent cnidarian predators: mechanism, function, and evolution // *Invertebr. Biol.* – 2017. – V. 136. – P. 75-91.
50. Gorbushin A.M., Levakin I.A., Panchina N.A., Panchin Y.V. *Hydrobia ulvae* (Gastropoda: Prosobranchia): A new model for regeneration studies // *J. Exp. Biol.* – 2001. – V. 204. – P. 283-289.
51. Guimond J. C., Lévesque M., Michaud P. L., Berdugo J., Finnson K., Philip A., Roy S. BMP-2 functions independently of SHH signaling and triggers cell condensation and apoptosis in regenerating axolotl limbs // *BMC Developmental Biology.* – 2010. – V.10. – P. 1-16.
52. Hallas J.M., Chichvarkhin A., Gosliner T.M. Aligning evidence: concerns regarding multiple sequence alignments in estimating the phylogeny of the Nudibranchia suborder Doridina Subject // *R. Soc. open Sci.* – 2017. – V. 4. – P. 1-21.
53. Hasse B., Ehrenberg H., Marxen J.C., Becker W., Epple M. Calcium carbonate modifications in the mineralized shell of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* // *Chemistry– A European Journal.* – 2000. – V. 6. – № 20. – P. 3679-3685.
54. Haszprunar G. Ultrastructure of the pseudo-protonephridium of the enigmatic opisthobranch, *Rhodope transtrosa* (Gastropoda, Nudibranchia) // *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology.* – 1997. – V. 29. – P. 371-378.

55. Haszprunar G., Künz E. Ultrastructure and systematic significance of the epidermis and haemocoel of *Rhodope* (Gastropoda, Nudibranchia, Doridoidea?) // J. Submicrosc. Cytol. Pathol. – 1996. – V. 28. – P. 485-497.
56. Jacob D.E., Soldati A.L., Wirth R., Huth J., Wehrmeister U., Hofmeister, W. Nanostructure, composition and mechanisms of bivalve shell growth // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 2008. – V. 72. – № 22.– P. 5401-5415.
57. Jörger K.M., Neusser T.P., Haszprunar G., Schrödl M. Undersized and underestimated: 3D visualization of the Mediterranean interstitial acochlidian gastropod *Pontohedyle milaschewitchii* (Kowalevsky, 1901) // *Organisms Diversity & Evolution*. – 2008. – V. 8. – № 3. – P. 194-214.
58. Jörger K.M., Brenzinger B., Neusser T.P., Martynov A.V., Wilson N.G., Schrödl, M. Panpulmonate habitat transitions: tracing the evolution of *Acochlidia* (Heterobranchia, Gastropoda) // *BioRxiv*. – 2014. – P. 010322.
59. Jones W.C., Jenkins D.A. Calcareous sponge spicules: a study of magnesian calcites // *Calcified Tissue Research*. – 1969. – V. 4. – P. 314-329.
60. Kasamesiri P., Meksumpun S., Meksumpun C. Spicule network patterns of *Phyllidia varicosa* // *Sci.Asia*. – 2011. – V. 37. – P. 160-164.
61. Killian C.E., Wilt F.H. Molecular aspects of biomineralization of the echinoderm endoskeleton // *Chemical reviews*. – 2008. – V. 108.– №11. – P. 4463-4474.
62. Kingsley R.J. Spicule formation in the invertebrates with special reference to the gorgonian *Leptogorgia virgulata* // *Integr. Comp. Biol.* – 1984. – V. 24. – P. 883-891.
63. Koga H., Morino Y., Wada H. The echinoderm larval skeleton as a possible model system for experimental evolutionary biology // *Genesis*. – 2014. – V. 52. – P. 186-192
64. Kocot K.M., McDougal C., Degnan B.M. Developing perspectives on molluscan shells, Part 1: Introduction and molecular biology // *Physiol. Molluscs. A Collect. Sel. Rev.* – 2017. – V. 1. – P. 1-42.
65. Kress A. A scanning electron microscope study of notum structures in some dorid nudibranchs (Gastropoda: Opisthobranchia) // *J. mar. biol. Ass. UK*. – 1981. – V. 61. – P. 177-191.
66. Kress A. Untersuchungen zur histologie, autotomie und regeneration dreier *Doto*-Arten *Doto coronata*, *D. pinnatifida*, *D. fragilis* // *Kundig*. – 1968. (цит. по Короткова Г.П., 1997)
67. Lambert, G. Ultrastructural aspects of spicule formation in the solitary ascidian *Herdmania momus* (Urochordata, Ascidiacea) // *Acta Zoologica*. – 1992. – V. 73. – № 4. – P. 237-245.
68. Lambert G., Lambert C.C. Spicule formation in the New Zealand ascidian *Pyura pachydermatina* (Chordata, Ascidiacea) // *Connective tissue research*. – 1996. – V. 34. – № 4. – P. 263-269.

69. Lambert G., Lambert C.C. Spicule formation in the solitary ascidian, *Herdmania momus* // Journal of Morphology. – 1987. – V. 192. – № 2. – P. 145-159.
70. Lavrov A.I., Bolshakov F.V., Tokina D.B., Ereskovsky A.V. Sewing up the wounds: The epithelial morphogenesis as a central mechanism of calcareous sponge regeneration // Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution. – 2018. – V. 330. – № 6-7. – P. 351-371.
71. Le Roy N., Jackson D.J., Marie B., Ramos-Silva P., Marin F. The evolution of metazoan α -carbonic anhydrases and their roles in calcium carbonate biomineralization // Frontiers in Zoology. – 2014. – V. 11. – P. 1-16.
72. Le Roy N., Ganot P., Aranda M., Allemand D., Tambutté S. The skeleton of the red coral *Corallium rubrum* indicates an independent evolution of biomineralization process in octocorals // BMC Ecology and Evolution. – 2021. – V. 21. – P. 1-21.
73. Ledger P.W., Jones W.C. Spicule formation in the calcareous sponge *Sycon ciliatum* // Cell and Tissue Research. – 1977. – V. 181. – P. 553-567.
74. Leise E.M. Chiton integument: metamorphic changes in *Mopalia muscosa* (Mollusca, Polyplacophora) // Zoomorphology. – 1984. – V. 104. – P. 337-343.
75. Lowenstam H.A., Weiner S. Mineralization by organisms and the evolution of biomineralization // Biominer. Biol. Met. Accumul. – 1983. – P. 191-203.
76. Lowenstam H.A., Weiner S. (1989). *On biomineralization*. Oxford University Press, USA.
77. Łukowiak M. Late Eocene siliceous sponge fauna of southern Australia: reconstruction based on loose spicules record // Zootaxa. – 2015. – V. 3917. – № 1. – P. 1-65.
78. Łukowiak M., Cramer K.L., Madzia D., Hynes M.G., Norris R.D., Dea A.O. Historical change in a Caribbean reef sponge community and long-term loss of sponge predators // Marine Ecology Progress Series. – 2018. – V. 601. – P. 127-137.
79. Łukowiak M. Utilizing sponge spicules in taxonomic, ecological and environmental reconstructions: a review // PeerJ. – 2020. – V. 8. – P. e10601.
80. Łukowiak M., Van Soest R., Klautau M., Pérez T., Pisera A., Tabachnick K. The terminology of sponge spicules // Journal of Morphology. – 2022. – V. 283. – № 12. – P. 1517-1545.
81. Odum H.T. Nudibranch spicules made of amorphous calcium carbonate // Science. – 1951. – V. 114. – P. 395.
82. Mann K., Wilt F.H., Poustka, A.J. Proteomic analysis of sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) spicule matrix // Proteome science. – 2010. – V. 8. – P. 1-12.

83. Marie B., Marin F., Marie A., Bédouet L., Dubost L., Alcaraz G., Milet C., Luquet G. Evolution of nacre: Biochemistry and proteomics of the shell organic matrix of the cephalopod *Nautilus macromphalus* // *ChemBioChem*. – 2009. – V. 10. – P. 1495-1506.
84. Marin F., Bundeleva I., Takeuchi T., Immel F., Medakovic D. Organic matrices in metazoan calcium carbonate skeletons: composition, functions, evolution // *Journal of structural biology*. – 2016. – V. 196. – № 2. – P. 98-106.
85. Maroyan A. The time course and neuroanatomy of rhinophore regeneration in the nudibranch *Berghia stephanieae*. 2021.
86. Matranga V., Bonaventura R., Costa C., Pinsino A., Russo R., Zito F. Echinoderms as blueprints for biocalcification: regulation of skeletogenic genes and matrices // *Molecular Biomineralization*. – 2011. – P. 225-248.
87. Meenakshi V.R., Blackwelder P.L., Wilbur K.M. An ultrastructural study of shell regeneration in *Mytilus edulis* (Mollusca: Bivalvia) // *J. Zool.* – 1973. – V. 171. – P. 475-484.
88. Mikhlina A. L., Nikitenko E. D., Vortsepneva E. V. Not all heroes wear shells: New data on the spicules' morphology in acochlidimorph mollusc // *Acta Zoologica*. – 2024. – V. 0. – P. 1-12.
89. Miller J.A., Byrne M. Ceratal autotomy and regeneration in the aeolid nudibranch *Phidiana crassicornis* and the role of predators // *Invertebr. Biol.* – 2005. – V. 119. – P. 167-176.
90. Millonig G. Study on the factors which influence preservation of fine structure // *Symp electron Microsc.* – 1964. – P. 347.
91. Mironov A.N. Pourtalesiid sea urchins (Echinodermata: Echinoidea) of the northern Mid-Atlantic Ridge // *Marine Biology Research*. – 2008. – V. 4. – № 1-2. – P. 3-24.
92. Mitogawa K., Hirata A., Moriyasu M., Makanae A., Miura S., Endo T., Satoh A. Ectopic blastema induction by nerve deviation and skin wounding: a new regeneration model in *Xenopus laevis* // *Regeneration*. – 2014. – V. 1. – № 2. – P. 26-36.
93. Moles J., Wägele H., Uhl G., Avila C. Bipolarity in sea slugs: a new species of *Doridunculus* (Mollusca: Nudibranchia: Onchidoridoidea) from Antarctica // *Organisms Diversity & Evolution*. – 2017. – V. 17. – P. 101-109.
94. Morse M.P. *Hedylopsis risen* sp.n., a new interstitial mollusc from the New England Coast (Opisthobranchia, Acochliidae) // *Zool. Scr.* – 1976. – V. 5. – P. 221-229.
95. Müller W. E., Rothenberger M., Boreiko A., Tremel W., Reiber A., Schröder, H. C. Formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula* // *Cell and Tissue Research*. – 2005. – V. 321. – № 2. – P. 285-297.
96. Murdock D.J. The 'biomineralization toolkit' and the origin of animal skeletons // *Biological Reviews*. – 2020. – V. 95. – № 5. – P. 1372-1392.

97. Neusser T. P., Martynov A. V., Schrödl M. Heartless and primitive? 3D reconstruction of the polar acochlidian gastropod *Asperspina murmanica* // *Acta Zoologica*. – 2009. – V. 90. – № 3. – P. 228-245.
98. Nikitenko E.D., Borisenko I.E., Anisenko A.N., Vortsepneva E.V. Transcriptomic sequence dataset of a potential new model species for studying biomineralization *Onchidoris muricata* (Nudibranchia, Gastropoda, Mollusca) // *Data in Brief*. – 2024. – V. 54. – P. 1-9.
99. Odum H. T. Nudibranch spicules made of amorphous calcium carbonate // *Science*. – 1951. – V. 114. – № 2963. – P. 395-395.
100. Okazaki K. Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo // *American Zoologist*. – 1975. – V. 15. – № 3. – P. 567-581.
101. Parker S. A study of calcium carbonate formation in biological systems (Doctoral dissertation, University of Oxford). – 1983.
102. Pellettieri J., Fitzgerald P., Watanabe S., Mancuso J., Green D. R., Alvarado A. S. Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration // *Developmental biology*. – 2010. – V. 338. – № 1. – P. 76-85.
103. Penney B.K. Morphology and biological roles of spicule networks in *Cadlina luteomarginata* (Nudibranchia, Doridina) // *Invertebr. Biol.* – 2006. – V. 125. – P. 222-232.
104. Penney B.K. Phylogenetic comparison of spicule networks in cryptobranchiate dorid nudibranchs (Gastropoda, Euthyneura, Nudibranchia, Doridina) // *Acta Zool.* – 2008. – V. 89. – P. 311-329.
105. Penney B.K., Ehresmann K.R., Jordan K.J., Rufo G. Micro-computed tomography of spicule networks in three genera of dorid sea-slugs (Gastropoda: Nudipleura: Doridina) shows patterns of phylogenetic significance // *Acta Zool.* – 2020. – V. 101. – P. 5-23.
106. Politi Y., Arad T., Klein E., Weiner S., Addadi L. Sea urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase // *Science*. – 2004. – V. 306. – № 5699. – P. 1161-1164.
107. Potts G.W. The anatomy of respiratory structures in the dorid nudibranchs, *Onchidoris bilamellata* and *Archidoris pseudoargus*, with details of the epidermal glands // *J. mar. biol. Ass. U.K.* – 1981. – V. 61. – P. 959-982.
108. Prenant A. Contribution à l'histogénèse de l'émail dentaire. Librairie Octave Doin Paris. – 1924.
109. Rahman M. A., Oomori T. Structure, crystallization and mineral composition of sclerites in the alcyonarian coral // *Journal of Crystal Growth*. – 2008. – V. 310. – № 5. – P. 3528-3534.
110. Reamur R. De la formation et de l'accroissement des coquilles des animaux tant terrestres qu'aquatiques, soit de mer, soit de rivière // *Mém. Acad. r. Sci. Paris*. 1709. – P. 363-400.

111. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell. Biol. – 1963. – V. 17. – P. 208-212.
112. Riedl R. Beiträge zur Kenntnis der *Rhodope veranii*. Geschichte und Biologie // Zoologischer Anzeiger. – 1960. – V. 163. – P. 107– 122.
113. Rieger R.M., Sterrer W. New spicular skeletons in Turbellaria, and the occurrence of spicules in marine meiofauna // Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research. – 1975. – V. 13. – № 4. – P. 207-278.
114. Ros J. Sistemas de defensa en los Opisthobranchios // Oecologia Aquat. – 1976. – V. 2. – P. 41-77.
115. Rose R.A. Lecithotrophic development of *Hoplodoris nodulosa* (Angas) (Opisthobranchia, Gastropoda) // J. Malacol. Soc. Aust. – 1983. – V. 6. – P. 63-70.
116. Ruthensteiner B., Heß M. Embedding 3D models of biological specimens in PDF publications // Microsc. Res. Tech. – 2008. – V. 71. – P. 778-786.
117. Saleuddin A.S.M., Wilbur K.M. Shell regeneration in *Helix pomatia* // Can. J. Zool. – 1969. – V. 47. – P. 51-53.
118. Salvini-Plawen L. Neue scandinavische Aplacophora (Mollusca, Aculifera) // Sarsia. – 1967. – V. 27. – P. 1-63.
119. Salvini-Plawen L. Zur Morphologie und Phylogenie der Mollusken: die Beziehungen der Caudofoveata und der Solenogastres als Aculifera, als Mollusca und als Spiralia // Zeitschrift für wissenschaftliche Zool. – 1972. – V. 184. – P. 205-394.
120. Sánchez-Tocino L., Tierno de Figueroa J.M., Cervera J.L. Ontogenetic changes in the spicule formation and their possible role in chromodorid opisthobranchs (Mollusca, Chromodorididae) // Mar. Biol. Res. – 2014. – V. 10. – P. 357-373.
121. Sandford, F. Physical and chemical analysis of the siliceous skeletons in six sponges of two groups (Demospongiae and Hexactinellida) // Microscopy Research and Technique. – 2003. – V. 62. – № 4. – P. 336-355.
122. Scheltema A.H. Aplacophora as progenetic aculiferans and the coelomate origin of mollusks as the sister taxon of Sipuncula // Biol. Bull. – 1993. – V. 184. – P. 57-78.
123. Schmekel, L., W. Wechsler. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Struktur und Entwicklung der Epidermis von *Trinchesia granosa* (Gastr. Opisthobranchia) // Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie. 1967. – V. 77.– P. 95-114.
124. Schrödl M. Taxonomic revision of the common South American nudibranch *Anisodoris fontaini* (D'Orbigny, 1837), with discussion of its systematic placement // Journal of Molluscan Studies. – 2000. – V. 66. – P. 69-82.

125. Schrödl M., Neusser T.P. Towards a phylogeny and evolution of Acochlidia (Mollusca: Gastropoda: Opisthobranchia) // Zoological Journal of the Linnean Society. – 2010. – V. 158. – № 1. – P. 124-154.
126. Schwabe E., Tsiamis K. Just undiscovered or invasive? The first record of a chiton (Mollusca: Polyplacophora) from the remote Ascension Island, southern Atlantic Ocean // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. – 2017. – V. 97. – № 4. – P. 727-733.
127. Shimizu K., Cha J., Stucky G.D., Morse, D.E. Silicatein α : cathepsin L-like protein in sponge biosilica // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – V. 95. – № 11. – P. 6234-6238.
128. Shimizu K., Nishi M., Sakate Y., Kawanami H., Bito T., Arima J., Leria L., Maldonado M. Silica-associated proteins from hexactinellid sponges support an alternative evolutionary scenario for biomineralization in Porifera // Nature Communications. – 2024. – V. 15. – № 1. – P. 181.
129. Skidmore R., Rivera E.R. Cytochemistry of the long-necked cells in the foot of *Onchidoris muricata* (Nudibranchia) // Biol. Bull. – 1982. – V. 162. – P. 113-123.
130. Song X., Liu Z., Wang L., Song L. Recent advances of shell matrix proteins and cellular orchestration in marine molluscan shell biomineralization // Frontiers in Marine Science. – 2019. – V. 6. – P. 41.
131. Staubach S., Klusmann-Kolb A. The cephalic sensory organs of *Acteon tornatilis* (Linnaeus, 1758) (Gastropoda Opisthobranchia) - cellular innervation patterns as a tool for homologisation // Bonner Zoologische Beiträge. – 2007. – V. 55. – № 3/4. – P. 311.
132. Stumpp M., Hu M.Y., Melzner F., Gutowska M.A., Himmerkus N., Holtmann W.C., Dupont S.T., Thorndyke M.C., Bleich M. Acidified seawater impacts sea urchin larvae pH regulatory systems relevant for calcification // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2012. – V. 109. – P. 18192-18197.
133. Su X.W., Zhang D.M., Heuer A.H. Tissue Regeneration in the shell of the giant queen conch, *Strombus gigas* // Chem Mater. – 2004. – V. 16. – P. 581-593.
134. Suzuki M., Kameda J., Sasaki T., Saruwatari K., Nagasawa H., Kogure T. Characterization of the multilayered shell of a limpet, *Lottia kogamogai* (Mollusca: Patellogastropoda), using SEM-EBSD and FIB-TEM techniques // J. Struct. Biol. – 2010. – V. 171. – P. 223-230.
135. Timmermans L.P.M. Studies on shell formation in molluscs // Netherlands J. Zool. – 1969. – V. 19. – P. 417-523.
136. Tartakovskaia O.S., Borisenko S.L., Zhukov V.V. Age factor in eye regeneration of the gastropod mollusk *Achatina fulica* // Biol. Bull. – 2003. – V. 30. – P. 285-292.

137. Tiozzo S., Copley R.R. Reconsidering regeneration in metazoans: an evo-devo approach // *Frontiers in Ecology and Evolution*. – 2015. – V. 3. – P. 67.
138. Thompson T.E. The natural history, embryology, larval biology and post-larval development of *Adalaria proxima* (Alder and Hancock) (Gastropoda Opisthobranchia) // *Philos. Trans. R. Soc. London*. – 1958. – V. 242. – P. 1-65.
139. Thompson T.E. Defensive adaptations in Opisthobranchs // *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* – 1960. – V. 39. – P. 123-134.
140. Thompson T.E. Observations on the life history of the nudibranch *Onchidoris muricata* (Müller) // *Journal of Molluscan Studies*. – 1961. – V. 34. – № 5. – P. 239-242.
141. Thompson T.E. Detection of epithelial acid secretions in marine molluscs: Review of techniques, and new analytical methods // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. – 1983. – V. 74. – № 3. – P. 615-621.
142. Treves K., Traub W., Weiner S., Addadi, L. Aragonite formation in the chiton (Mollusca) girdle // *Helvetica Chimica Acta*. – 2003. – V. 86. – № 4. – P. 1101-1112.
143. Tuchina O., Meyer-Rochow V.B. Regeneration of the visual system in gastropods (Mollusca) // *Invertebr. Biol.* – 2010. – V. 129. – P. 27-38.
144. Ugorri V., Señarís M. P., Díaz-Agras G., Candás M., Gómez-Rodríguez C. *Doris adrianae* sp. nov. (Heterobranchia; Nudibranchia; Doridina) from the Galician coasts (NW Iberian Peninsula) // *Nova Acta Científ. Compost.* – 2021. – V. 28. – P. 1-33.
145. Uriz M. J., Turon X., Becerro M.A. Silica deposition in Demosponges: spiculogenesis in *Crambe crambe* // *Cell and Tissue Research*. – 2000. – V. 301. – P. 299-309.
146. Uriz M.J., Turon X., Becerro M.A., Agell G. Siliceous spicules and skeleton frameworks in sponges: origin, diversity, ultrastructural patterns, and biological functions // *Microscopy Research and Technique*. – 2003. – V. 62. – № 4. – P. 279-299.
147. Voigt O., Adamski M., Sluzek K., Adamska M. Calcareous sponge genomes reveal complex evolution of α -carbonic anhydrases and two key biomineralization enzymes // *BMC Evolutionary Biology*. – 2014. – V. 14. – P. 1-19.
148. Voigt O., Adamska M., Adamski M., Kittelmann A., Wencker L., Wörheide G. Spicule formation in calcareous sponges: coordinated expression of biomineralization genes and spicule-type specific genes // *Scientific Reports*. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 45658.
149. Voigt O., Fradusco B., Gut C., Kevrekidis C., Vargas S., Wörheide G. Carbonic anhydrases: an ancient tool in calcareous sponge biomineralization // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – V. 12. – P. 624533.

150. Wägele H. "Histological investigation of some organs and specialised cellular structures in Opisthobranchia (Gastropoda) with the potential to yield phylogenetically significant characters // Zoologischer Anzeiger. – 1998. – V. 236. – P. 119-132.
151. Wägele H., Cervera J.L. Histological study of *Goniodoris castanea* Alder and Hancock, 1845 (Nudibranchia, Doridoidea, Goniodorididae) // J. Morphol. – 2001. – V. 250. – P. 61-69.
152. Wagge L.E., Mittler T. Shell regeneration in some British molluscs // Nature. – 1953. – V. 171. – P. 528-529.
153. Wang X., Wiens M., Schröder H.C., Schloßmacher U., Pisignano D., Jochum K.P., Müller W.E. Evagination of cells controls bio-silica formation and maturation during spicule formation in sponges // PLoS One. – 2011. – V. 6. – № 6. – P. 1-11.
154. Watabe N. Shell Repair // The Mollusca. – Academic. Press. – 1983.
155. Weiner S., Levi-Kalisman Y., Raz S., Addadi L. Biologically formed amorphous calcium carbonate // Connect. Tissue Res. – 2003. – V. 44. – P. 214-218.
156. Wendt C., Rossi A.L., Cypriano J., Dilnei de Castro Oliveira C., Arrouvel C., Werckmann J., Farina M. The Caudofoveata (Mollusca) spicule as a biomineralization model: Unique features revealed by combined microscopy methods // Minerals. – 2023. – V. 13.– № 6. – P. 1-14.
157. Wilson N.G., Jörger K.M., Brenzinger B., Schrödl M. Phylogenetic placement of the enigmatic worm-like Rhodopemorpha slugs as basal Heterobranchia // Journal of Molluscan Studies. – 2017. – V. 83. – № 4. – P. 399-408.
158. Wilt F.H. Biomineralization of the spicules of sea urchin embryos // Zoological science. – 2002. – V. 19. – № 3. – P. 253-261.
159. Wilt F., Killian C.E., Croker L., Hamilton P. SM30 protein function during sea urchin larval spicule formation // Journal of structural biology. – 2013. – V. 183. – № 2. – P. 199-204.
160. Woodland W. Studies in spicule formation // Journal of Cell Science. – 1907. – V. 2. – № 201. – P. 31-44.

8 Приложение

8.1 Таблицы

8.1.1 Таблицы к главе «Введение»

Таблица 1.1. Данные о спикюлогенезе в разных группах беспозвоночных по литературным данным

Таксономическая группа	Данные о морфологии	Химический состав	Локализация	Формирование	Органический матрикс	Регуляция минерализации	Регенерация
1	2	3	4	5	6	7	8
Инфузории (Ciliata, р. <i>Remanella</i>)	Есть данные	Аморфный известковый материал	Внутриклеточно. Упорядочены веерообразно в передней части животного, но ориентированы продольно по краям и вокруг ядер, а в остальной части тела поперечно	Нет данных	Состав не определен	Нет данных	Нет данных
Стеклянные губки	Есть данные	Стеклоаморфный кремнезем (SiO ₂ ·nH ₂ O)	Внеклеточно в мезохилле	Внутриклеточно в склероцитах, заканчивается внеклеточно	Силикатеин, глассин, персилин и другие	Есть данные	Нет данных
Известковые губки	Есть данные	Магнезиальный кальцит, кальцит	Внеклеточно в мезохилле	В межклеточной полости внутри группы склероцитов		Есть данные	Формируются <i>de novo</i>

Продолжение таблицы 1.1 Данные о спикулогенезе в разных группах беспозвоночных на основе литературных данных

Cnidaria	Есть данные	Кальцит с высоким содержанием магния и арагонит (Alcyonacea). Арагонит (Scleractinia)	Внеклеточно в мезоглее	Внутриклеточно внутри склеритобразующей вакуоли склеробласта, которая содержит органический матрикс.	Склеритин, коллагено-подобные белки, агрин-подобные гликопротеины и белки с сахаросвязывающими доменами	Есть данные	Нет данных
Platyhelminthes	Есть данные	Арагонит	В эпителии (<i>Florianella</i> , <i>Bertiliella</i> , <i>Acanthiella</i> , <i>Tyrrheniella sigillata</i>) В паренхиме (<i>Acanthomacrostroma</i>)	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Nemertina	Есть данные	Карбонат кальция	у основания эпидермиса или вблизи него и не выступают над его поверхностью	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Mollusca. Aplacophora	Есть данные	Арагонит		Одной эпителиальной клеткой. Начинается внутриклеточно, заканчивается внеклеточно.	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Mollusca. Polyplacophora	Есть данные	Арагонит	На поверхности эпителия	Одной или несколькими клетками эпителия.	Нет данных	Нет данных	Нет данных

Продолжение таблицы 1.1. Данные о спикулогенезе в разных группах беспозвоночных на основе литературных данных

1	2	3	4	5	6	7	8
Mollusca. Gastropoda. Heterobranchia. Nudibranchia, Acochliidiomorpha, Rhodopoidea	Есть данные	Кальцит (Acochliidiomorpha) Кальцит под сомнением (Rhodopoidea) Кальцит, ватерит, флуорит? – точная природа не определена (Nudibranchia)	Субэпидермальные внутриклеточные	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Echinodermata	Есть данные	Вариации кальцита (магнезийный, аморфный, кристаллический)	Внеклеточно	Синцитием из первичных мезенхимных клеток	Более 80 белков	Есть данные	Восстанавлива ются как поврежденные, так и формируются <i>de novo</i>
Asciacea	Есть данные	Арагонит, ватерит, кремний	Внеклеточно	Синцитием склероцитов	Гликопротеины	Нет данных	Нет данных

8. 1.2 Приложения к главе «Методология и методы исследования»

Таблица 2.1. Объекты и методы исследования

Метод исследования	Количество исследуемых особей <i>Onchidoris muricata</i>		
	Размерная группа		
	I	II	III
<i>Микроскопия</i>			
Световая микроскопия	80	95	90
Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)	30	40	42
Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ)	15	28	29
Трехмерная реконструкция	3	4	3
Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ)	15	40	34
<i>Томография</i>			
Компьютерная микротомография (микроКТ)	4	5	5
<i>Спектроскопия</i>			
Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДС)	10	10	10
Рамановская спектроскопия	5	5	5
<i>Молекулярные методы</i>			
Секвенирование	35	31	30
<i>In situ</i> гибридизация	60	60	25
<i>Экспериментальные методы</i>			
Минерализация (calcein)	30	30	30
Регенерация	0	114	104
Всего*	960		

*- некоторые особи были исследованы несколькими методами

Таблица 2.2. Параметры съемок *Onchidoris muricata* на компьютерных микротомографах SkyScan

<i>Размерная группа</i>	<i>Прибор</i>	<i>Сила тока (кВ)</i>	<i>Напряжение (мА)</i>	<i>Разрешение (мкм)</i>	<i>Использование фильтров</i>
I	Skyscan1172	40	250	2.02	Без фильтров
		25	110	1.45	Без фильтров
	SkyScan1272	60	166	0.85	Al 0.25mm
		67	116	1.50	Без фильтров
II	Skyscan1172	40	250	1.88	Без фильтров
		25	139	1.31	Без фильтров
		40	250	2.0	Без фильтров
	SkyScan1272	62	120	2.00	Без фильтров
		64	120	2.00	Без фильтров
III	Skyscan1172	91	110	1.66	Без фильтров
		91	110	2.69	Без фильтров
		91	110	2.0	Без фильтров
		40	250	1.21	Без фильтров
		40	250	2.21	Без фильтров

8. 1.3 Приложения к главе «Результаты»

Таблица 3.1. Линейные размеры спикул *Onchidoris muricata*

<i>Размер особи</i>	<i>Средняя длина спикул (мкм)</i>	<i>Средний диаметр спикул (мкм)</i>
<2 мм	10-20	1-3
>2–6 мм	50-100	3-10
6–10 мм	250-300	10-30

Таблица 3.2. Количество спикул в центральной части тела *Onchidoris muricata* (по данным микроКТ)

<i>Размер особи</i>	<i>Количество спикул</i>		
	<i>Нотум</i>	<i>Папилла</i>	<i>Нога</i>
3 мм	12	10	15
4 мм	12	10	17
6 мм	15	10	14
7 мм	14	9	15

Таблица 3.3. Последовательность восстановления ринофора *Onchidoris muricata* после полного удаления

<i>Время после ампутации</i>	<i>Изменение внешней структуры регенерата (форма, размеры)</i>	<i>Изменения ресничного покрова</i>	<i>Изменения внутренней структуры регенерата (данные СЭМ)</i>	<i>Изменения тонкой морфологии регенерата (данные гистологии, ТЭМ)</i>	<i>Особенности стикул</i>
1	2	3	4	5	6
Сразу после ампутации	Мышечное сокращение краев раны, сближение папилл ринофора				
3 чпа (3 часа после ампутации)	Не происходит			Процессы деградации, клеточной смерти	
24-36 чпа	Формирование округлой регенерационной почки	Поверхность регенерата гладкая, реснички отсутствуют		Формирование раневого эпителия, миграция амебоидных клеток нескольких типов к месту повреждения	
48 чпа – 72 чпа	Увеличение размеров регенерата, форма округлая конусообразная	Поверхность регенерата гладкая, реснички отсутствуют	Однородные поперечно-ориентированные волокна, небольшая полость внутри	Многочисленные волокна в просвете регенерата. Процессы клеточного деления и деградации.	
96 чпа	Увеличение размеров регенерата	Появляются островки ресничек в средней части регенерата		Многочисленные волокна в просвете не детектированы. Амебоидные клетки с длинными отростками. Активные деления в эпителии регенерата и в просвете	

Продолжение таблицы 3.3. Последовательность восстановления ринофора *Onchidoris muricata* после полного удаления

1	2	3	4	5	6
5 дней после ампутации (дпа)	Незначительное увеличение размеров регенерата	Островки ресничек по всей поверхности регенерата	Нет данных	Восстановление элементов нервной и мышечной систем. Амебоидные клетки с хорошо развитым синтетическим аппаратом	Детектирована первая спикула в апикальной части регенерата. Ультраструктурные особенности спикулы регенерата: меньшие размеры, по сравнению с интактными спикулами, осмиофильная обкладка вакуоли склероцита, внутриклеточный матрикс
7дпа	Увеличение размеров регенерата. Формирование округлой верхушки ринофора. Восстанавливается подвижность ринофора	Поверхность верхушки покрыта ресничками	В базальной части регенерата обнаружены мощные продольные мышечные пучки, полость ринофора отсутствует	В эпителии ринофора и кармана ринофора наблюдаются клеточные деления. Появляются амебоидные клетки, начинающие отделять лимфатическую полость ринофора. Много Икс клеток в эпителии.	Детектированы 4 слома спикул, диаметр которых 10-15мкм. Особенности ультратонкого строения подобно 5 дпа, осмиофильная обкладка вакуоли склероцита становится более выраженной

Продолжение таблицы 3.3. Последовательность восстановления ринофора *Onchidoris muricata* после полного удаления

1	2	3	4	5	6
8–10 дпа	Формируются складки ринофора. Верхушка ринофора хорошо выражена. Восстановление способности к сокращению регенерата	Верхушка ринофора покрыта ресничками. Отдельные островки ресничек распределены по всей поверхности регенерата	Нет данных	Базальная мембрана сильно изрезана. Большое количество Икс клеток в эпителии, формирующих эвагинации в субэпидермальное пространство. Восстановление триад – мышцы, нервы, спиккулы	Спиккулы ассоциированы со складками ринофора, расположены ближе к стенке регенерата. Встречаются как склероциты, участки мембраны вакуоли которых имеет бóльшую осмиофильность, так и склероциты, мембрана вакуоли которых по осмиофильности не отличается от мембраны самого склероцита. Содержимое вакуоли склероцита может быть аморфным и располагаться с низкой плотностью по всей площади вакуоли склероцита, либо иметь вид концентрических слоев с разной осмиофильностью

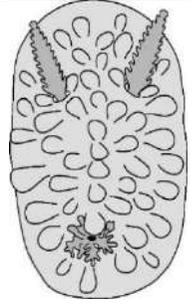
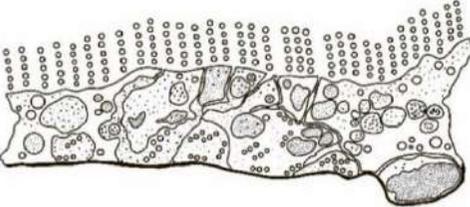
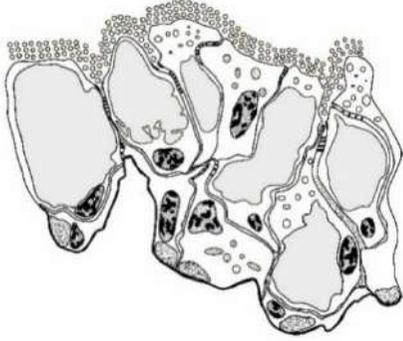
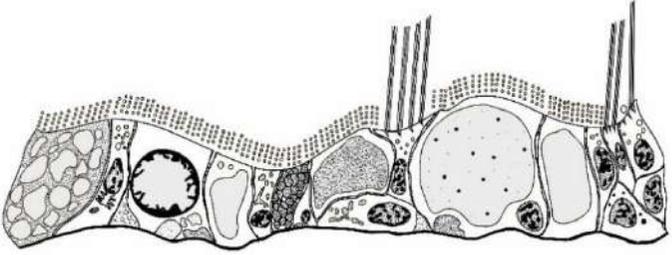
Продолжение таблицы 3.3. Последовательность восстановления ринофора *Onchidoris muricata* после полного удаления

1	2	3	4	5	6
12-13 дпа	Увеличение размеров регенерата. Под складками регенерата образуются врезающиеся борозды	Аналогично 8-10 дпа	Нет данных	Увеличение количества триад нервы-мышцы-спикул. Большое количество разветвленных клеточных элементов с осмиофильными гранулами и без них	Количество спикул увеличивается. Мембрана вакуоли склероцита всегда имеет участки повышенной осмиофильности. Содержимое вакуоли электронно-прозрачное, аморфный компонент выражен слабо, а если выражен – занимает пристеночное положение, имеет вид тяжей или скопления в просвете вакуоли
15 дпа	Формируются дополнительные складки регенерата	Аналогично 8-10 дпа	Хорошо развиты два пучка продольных мышц. Центральная полость регенерата выражена слабо	Увеличение количества триад нервы-мышцы-спикул. Количество гранулированных клеток уменьшается. Клеточные деления продолжают детектироваться в полости регенерата и в его покровном эпителии	Количество спикул увеличивается. В базальной части регенерирующего ринофора спикулы расположены ближе друг к другу, чем в апикальной части. Ультраструктурные особенности как на 12-13дпа

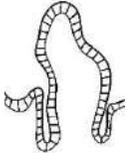
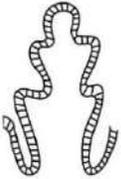
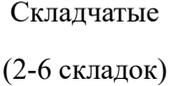
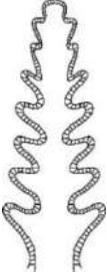
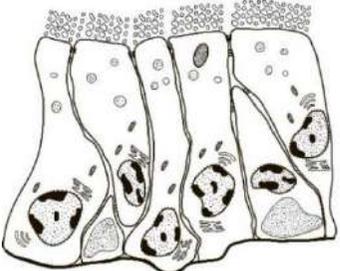
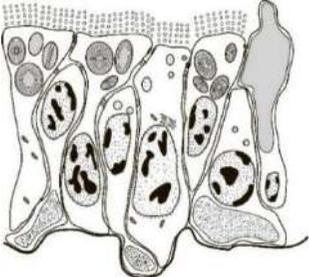
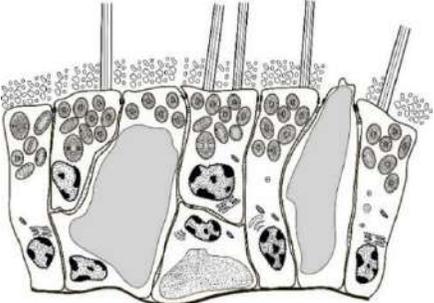
Продолжение таблицы 3.3. Последовательность восстановления ринофора *Onchidoris muricata* после полного удаления

1	2	3	4	5	6
18 дпа	Форма ринофора удлиненная. Складки регенерата расположены симметрично	Реснички формируют сплошной слой на поверхности регенерата	Хорошо развиты два пучка продольных мышц. Лимфатическая полость сформирована	Особенности тонкой морфологии аналогичны предыдущим дням	Спикулы также расположены одна под другой, но более упорядоченно, диаметр 10-15 мкм. Ультраструктурные особенности как на 12-13дпа
22 -25 дпа	Сформированы 4 складки регенерата	Аналогично 18 дпа	Восстановлена структура интактного ринофора	Особенности тонкой морфологии аналогичны предыдущим дням	Количество спикул увеличивается

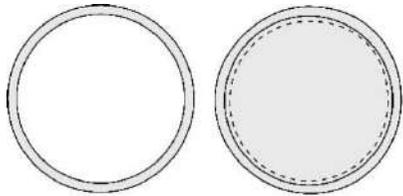
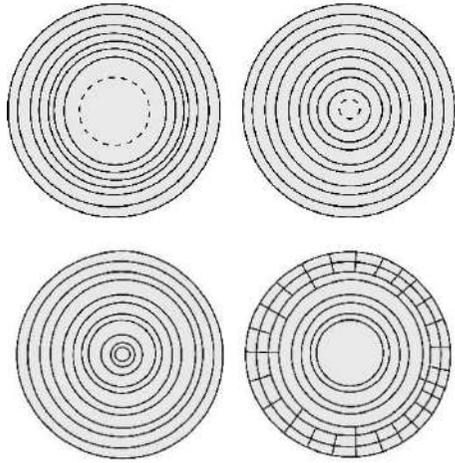
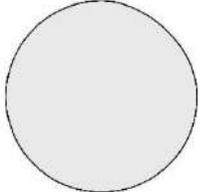
Таблица 3.4 Сводная таблица онтогенетических преобразований тела и покровов *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза

Стадия	Сразу после метаморфоза (I группа)	Ранние ювенили (I группа)	Ювенили (II группа)	Половозрелые особи (III группа)
	1	2	3	4
				
Размеры	100-1000мкм	1-2мм	2-4 мм	4-12 мм
Строение нотума	Гладкий	Появляются папиллы	Папиллы хорошо развиты	
Эпителий нотума				
	Ювенильный тип	Переходный тип	Взрослый тип	

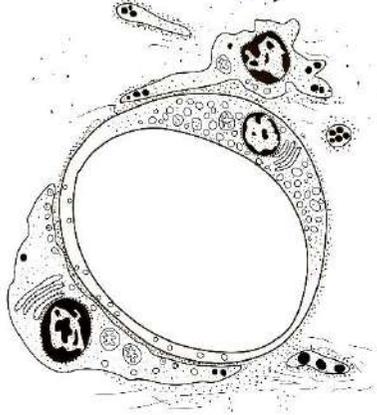
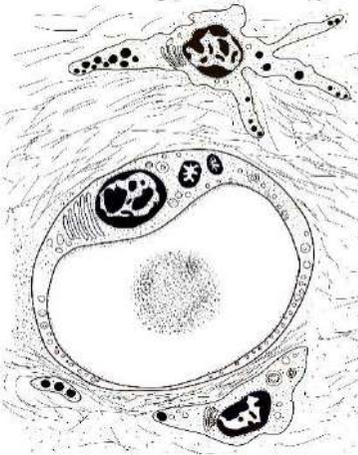
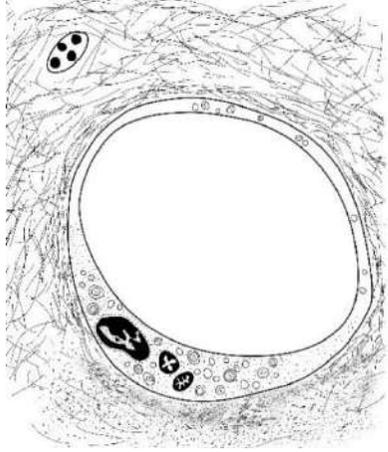
Продолжение таблицы 3.4. Сводная таблица онтогенетических преобразований тела и покровов *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза

	1	2	3	4
Ринофоры	 <p>Гладкие</p>	 <p>Складчатые (до 2 складок)</p>	 <p>Складчатые (2-6 складок)</p>	 <p>Складчатые (до 7-9 складок)</p>
Эпителий ринофоров	 <p>Хитиновые веретена в апикальной части клеток только начинают формироваться. Железистый компонент развит слабо</p>	 <p>Количество хитиновых веретен в апикальной части эпителия увеличивается, формируют до 2 рядов с дорсальной стороны складок ринофора. Увеличивается количество железистых клеток</p>	 <p>Количество хитиновых веретен в апикальной части эпителия увеличивается, формируют до 4 рядов с дорсальной стороны складок ринофора. Увеличивается количество и разнообразие железистых клеток</p>	

Продолжение таблицы 3.4. Сводная таблица онтогенетических преобразований тела и покровов *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза

	1	2	3	4	
Икс клетки в эпителии тела	Закладываются в базальной части эпителия, в вакуоли Икс клеток мелкозернистое содержимое	Икс клетки формируют многочисленные эвагинации в субэпидермальное пространство	Икс клетки имеются, но не формируют выпячивания в субэпидермальное пространство		
Спикульные тракты	Начинают появляться спикулы в центральной зоне нотума	Формируются горизонтальные и вертикальные тракты	Тракты сформированы		
Внутренняя морфология спикул (преобладающие типы)	 <p>Полая, рыхлая</p>		 <p>Переходные типы</p>		 <p>Монолитная</p>

Продолжение таблицы 3.4. Сводная таблица онтогенетических преобразований тела и покровов *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза

	1	2	3	4
Особенности склероцитов	 <p>Активная синтетическая активность</p>	 <p>Начало процессов деградации органелл</p>	 <p>Процессы деградации органелл</p>	
Содержимое склероцитов	Отсутствует		Есть или отсутствует	Отсутствует
Фибробласты	Ассоциированы со склероцитом		Расположены во внеклеточном пространстве на расстоянии от спикул	
Внеклеточный коллагеновый матрикс	Развит только вокруг спикул		Развит равномерно во внеклеточном пространстве	

Продолжение таблицы 3.4. Сводная таблица онтогенетических преобразований тела и покровов *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза

	1	2	3	4
Зоны роста (кальцификации) спикул	Нет данных	Концевые зоны, поверхность спикул	Концевые зоны, поверхность спикул	Отсутствует
Паттерн экспрессии карбоангидразы	В переходной зоне нотума (до 300мкм) В переходной зоне и склероцитах	В переходной зоне и склероцитах	В склероцитах	Отсутствует

8.2 Иллюстративный материал
8.2.1 Иллюстративный материал к главе «Введение»

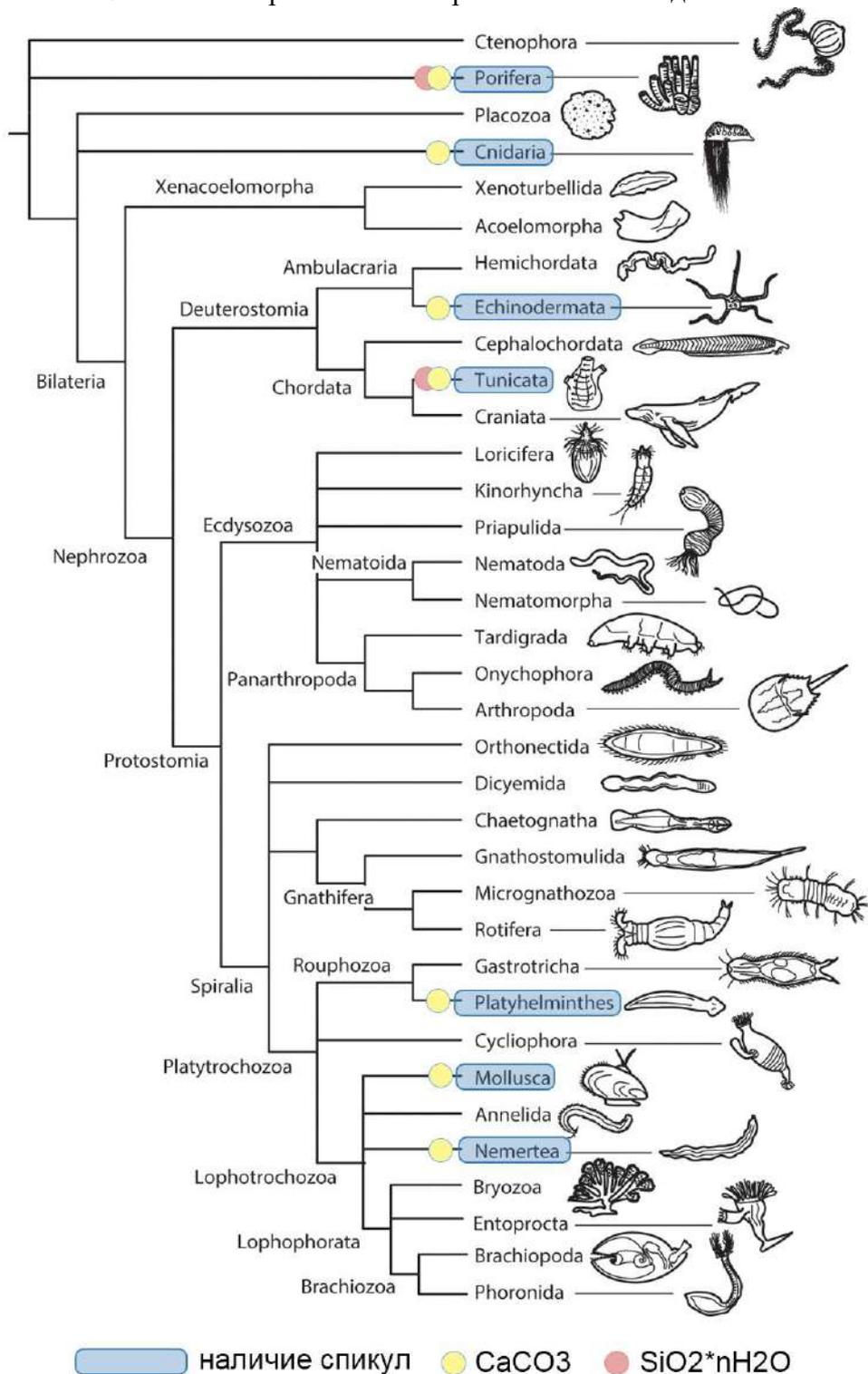


Рисунок 1.1. Распространение известковых и кремнеземных спикул в разных группах беспозвоночных животных. Филогенетическое дерево (по Giribet, Edgecombe, 2020 с изменениями).

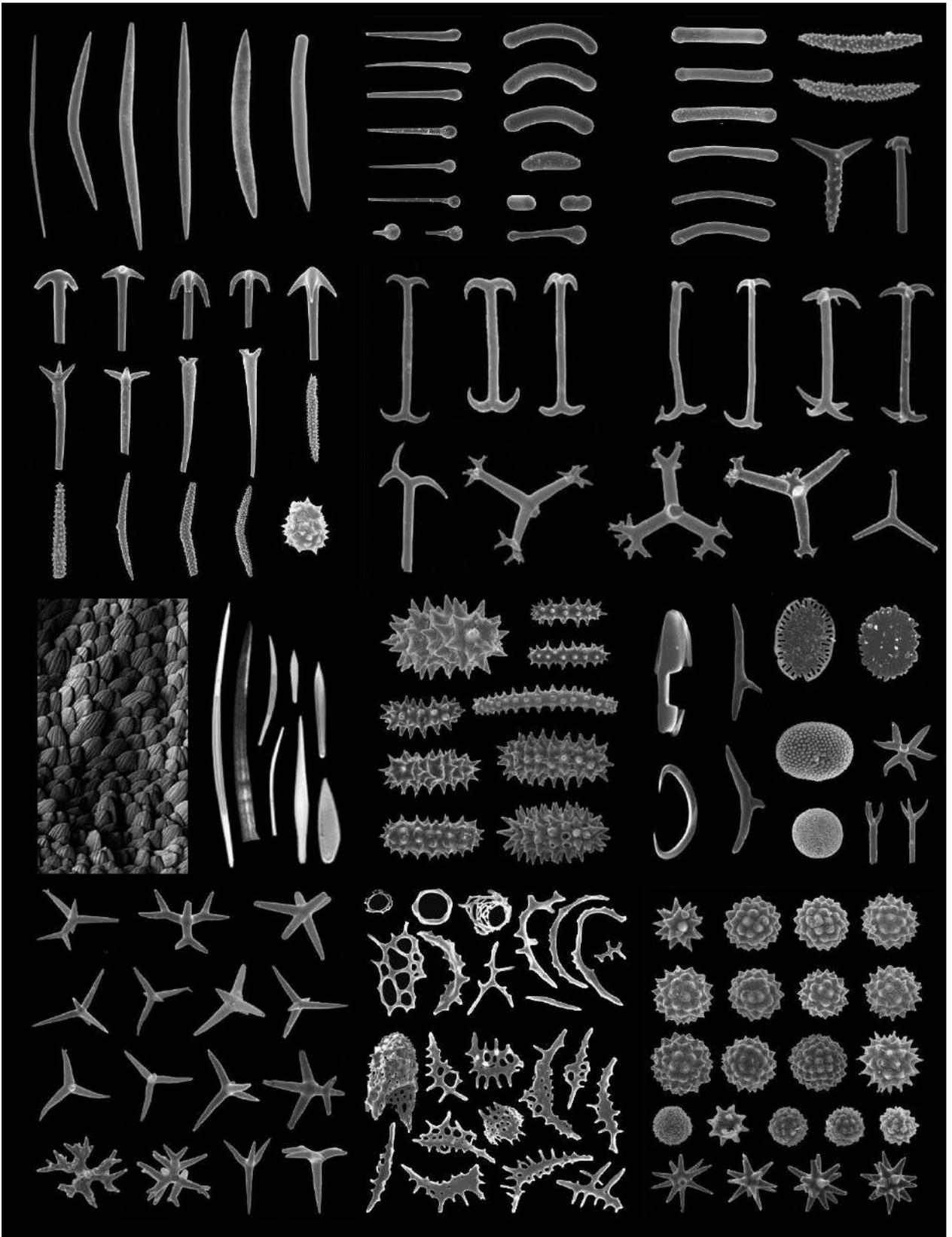


Рисунок 1.2. Разнообразие внешней морфологии спикул беспозвоночных животных (СЭМ). По Treves et al., 2003; Mironov, 2008; Carballo, Cruz-Barraza, 2010; Łukowiak, 2015; Schwabe, Tsiamis, 2017; Łukowiak, et al., 2018; Wendt et al., 2023.

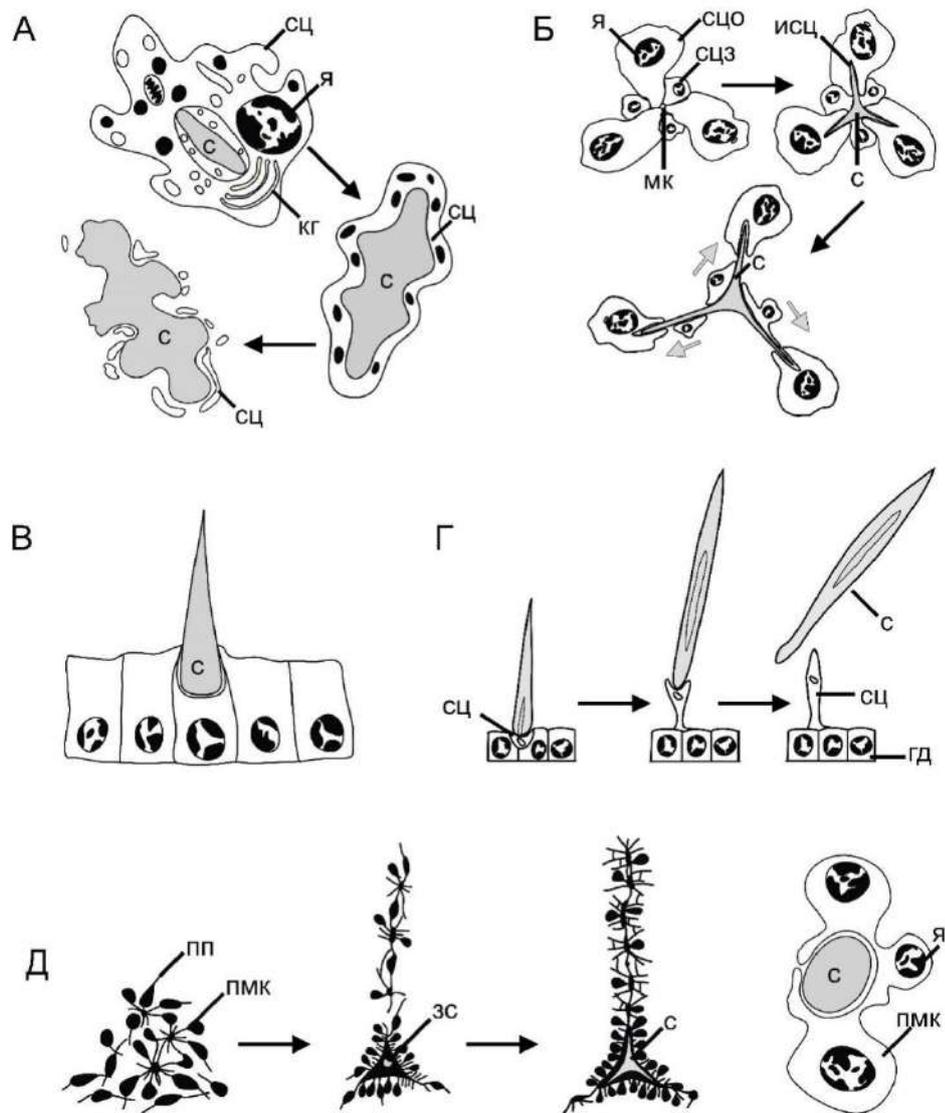


Рисунок 1.3. Способ формирования кальциевых спикул в разных группах беспозвоночных животных. А – спикулы восьмилучевых кораллов на примере *Leptogorgia virgulata* (Kingsley, 1984 с изменениями); Спикула начинает образовываться в вакуоли склероцита на основе органической матрицы, затем стенка склероцита разрушается, спикула выходит во внеклеточное пространство. Б – спикулы губок на примере трехосных спикул *Sycon ciliatum* (по Ledger, Jones, 1977, Voigt et al., 2017 с изменениями); спикулы формируются в специальной межклеточной камере, которую образуют склероциты. Удлинение и утолщение спикул происходит с помощью склероцитов разных типов (основателей и загустителей), серыми стрелками показано направление движения склероцитов–загустителей вдоль конкретных осей спикулы; В – спикула двустворчатых моллюсков (*Bivalvia*) (Carter, Aller, 1975) с изменениями; Г – спикулы Aplousophora и Polyplousophora на примере *Hiehypodermis* и *Proneomenia aglaopheniee* по Вудланду (Woodland, 1907) с изменениями; спикула синтезируется внеклеточно склеробластом над гиподермой; Д – спикулы морских ежей на примере *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Paracentrotus lividus* (Matranga et al., 2011; Stumpp et al., 2012) с изменениями; спикулы синтезируются в межклеточном пространстве, образованном синцитием первично мезодермальных клеток. Обозначения: гд – гиподерма; зс – зачаток спикулы; исц – инвагинация в склероците; кг – комплекс Гольджи; мк – межклеточная камера; пмк – первично мезодермальные клетки; пп – псевдоподии; с – спикула; сц – склероцит; сц0 – клетки основатели; сцз – клетки загустители; я – ядро.

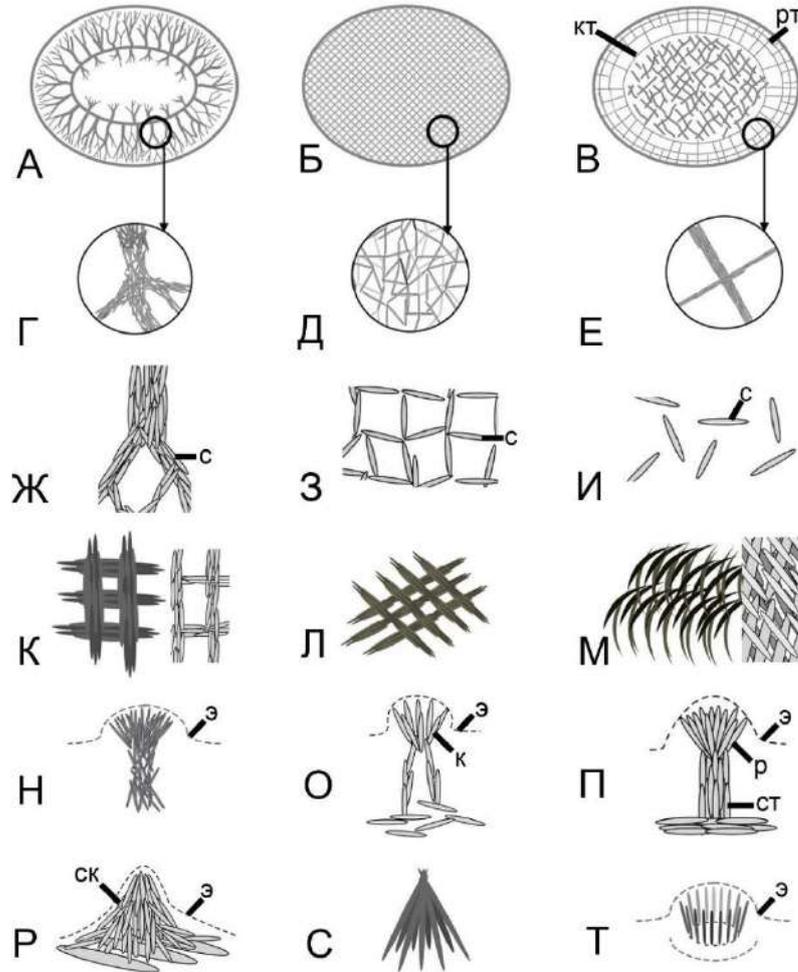


Рисунок 1.4. Схема строения спикульных трактов и сетей в группе Doridina (Nudibranchia) (Penney, 2008, Kasamesiri et al., 2011; Penney et al., 2020). А–М – тип строения горизонтального тракта нотума (вид с дорсальной стороны); Н–Т – типы строения вертикальных трактов в папиллах дорид (вид сбоку). А – дендритная сеть (*Cadlina luteomarginata*); Б – паутинная сеть (*Diaulula sandiegensis*); В – решетчатая сеть с кольцевым и радиальным трактами (*Phyllidia varicosa*); Г–Е – схема расположения спикул в краевой части нотума; Ж – спикулы в составе дендритной сети (*Cadlina*, *Aldisa*); З – особенности расположения спикул в центральной части решетчатой сети (*Doris*, *Peltodoris*); И – отдельные спикулы расположены хаотично на расстоянии друг от друга (*Berthella californica*); К – ортогональная сеть, спикулы расположены перпендикулярно друг другу и краю тела (*Phyllidiopsis cardinalis*); Л – спикулы распложены перпендикулярно друг другу, но под наклоном к краю тела (*Phyllidia varicoza*); М – сеть сложена несколькими перекрывающимися слоями спикул, каждый слой расположен под углом к передне-задней оси тела (*Onchidoris bilamellata*); Н – спикулы образуют розетку под эпителием папиллы, в основании папиллы спикулы образуют скопление (*C. luteomarginata*); О – спикулы апикальной части тракта формируют кольцо, основание сформировано двумя рядами спикул; П – спикулы апикальной части тракта формируют розетку, спикулы основания в виде столбчатой структуры (ст); Р – скопление спикул формирует неорганизованный бугорок; С – спикулы вертикального тракта формируют шалаше-подобную структуру; Т – один ряд спикул образует кольцо. Обозначения: к – кольцо спикул; кт – кльцевой тракт; р – розетка спикул; рт – падиальный тракт; с – спикула; ск – скопление спикул; э – эпителий.

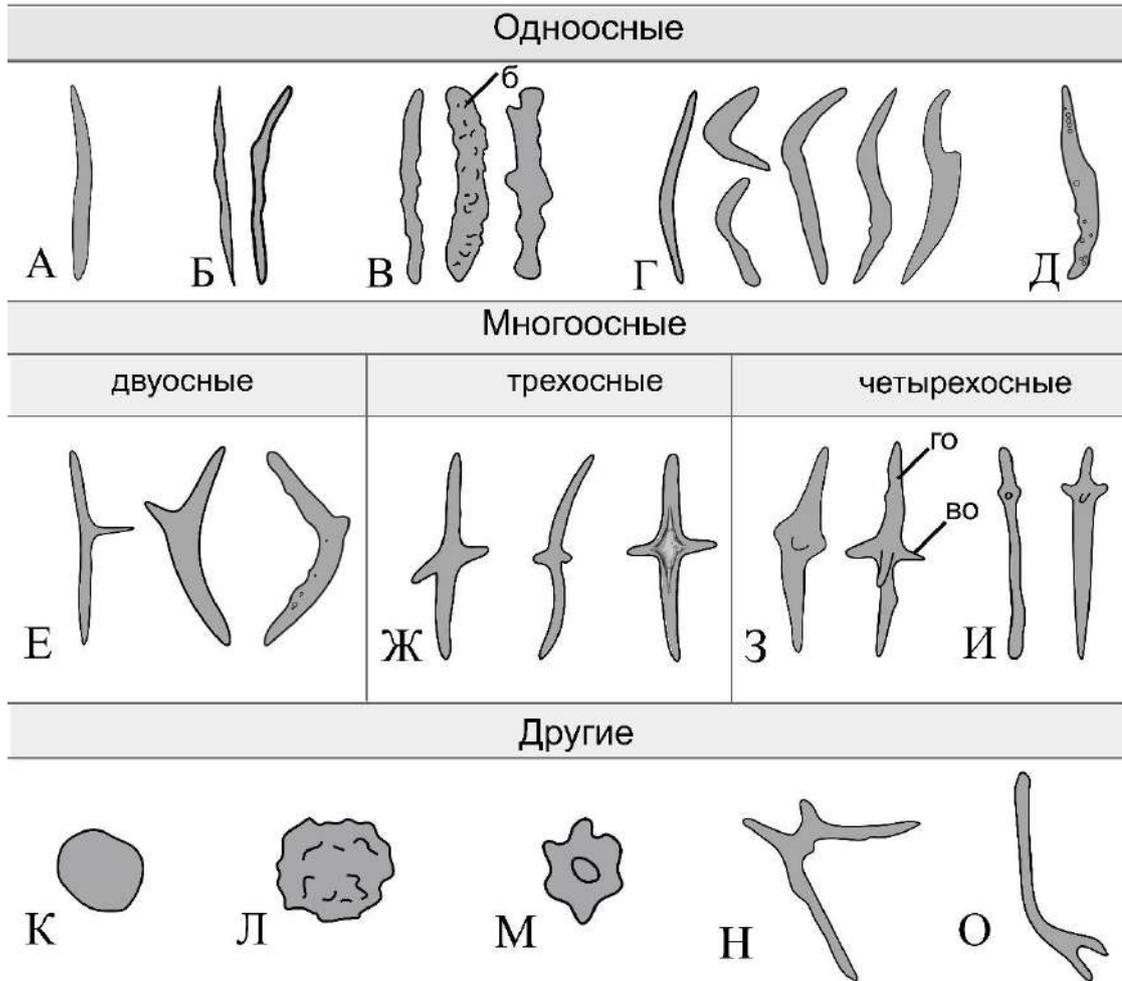


Рисунок 1.5. Внешняя морфология спикул дорид (Chang et al., 2013; Sánchez-Tocino et al., 2014). А–Д – одноосные спикулы; А – прямая спикула с закругленными концами (*Adalaria proxima*, *Acanthodoris pilosa*); Б – одноосные спикулы с неровностями и заостренными или округлыми концами (*Felimare*, *Felimida*); В – одноосные толстые спикулы с большим количеством бугорков и неровностей на поверхности (*Felimare*, *Felimida*); Г – одноосные спикулы с изгибом разной степени выраженности; Д – одноосная спикула с изгибом и бугорками (*Ad. proxima*); Е – двуосные спикулы прямые, с изгибом, с бугорками на поверхности (*Ad. proxima*, *Ac. pilosa*); Ж – трехосные спикулы прямые или с изгибом (*Ad. proxima*, *Phyllidia pustulosa*); З – И – четырехосные спикулы; З – четырехосные спикулы со вторичными осями различной степени выраженности, отходящими от центра главной оси; И – четырехосные спикулы со вторичными осями различной степени выраженности смещенными к периферии главной оси (*Ad. proxima*, *Felimare*, *Felimida*); К–М – сферические спикулы; К – сферический спикулы без внешней скульптуры (*Ac. pilosa*); Л – сферические спикулы с неровностями (*Felimare*, *Felimida*); М – сферические спикулы с бугорками (*Felimare*, *Felimida*); Н – Н-образные спикулы без выраженной главной оси (*Ad. proxima*); О – спикула с дихотомическим разветвлением на конце (*Ph. pustulosa*). Обозначения: б – бугорки; во – вторичная ось; го – главная ось.

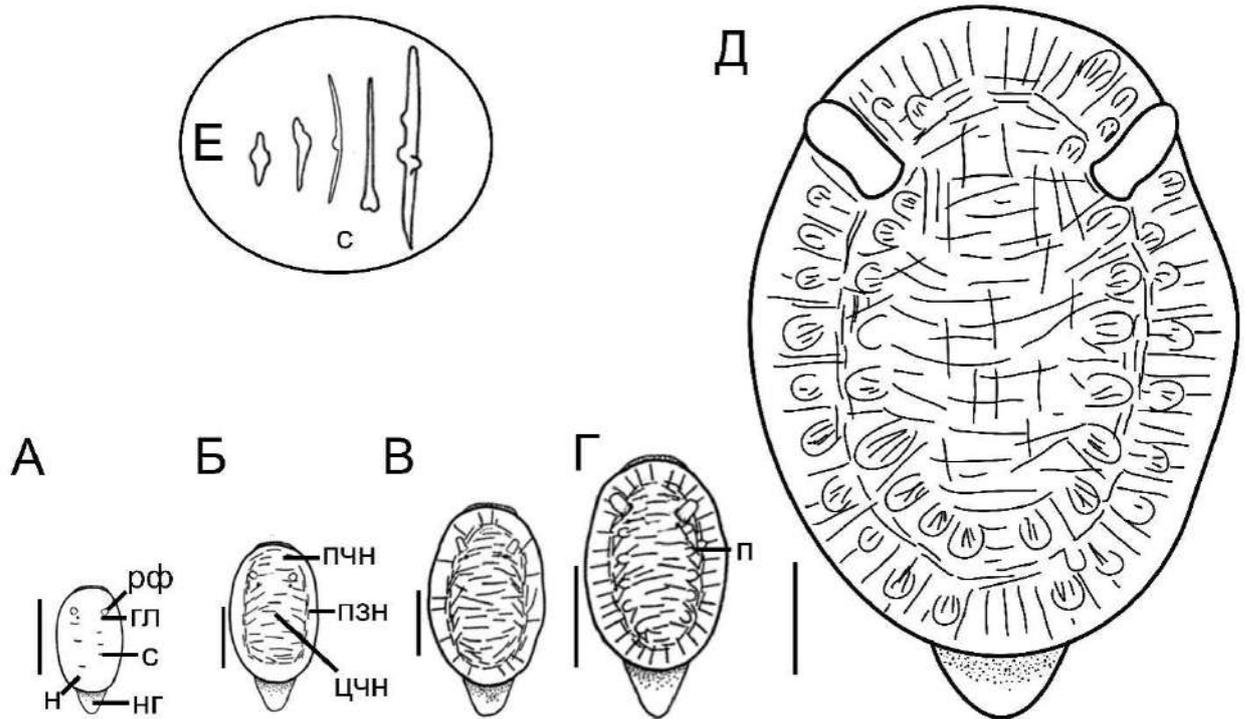


Рисунок 1.6. Развитие спикульного аппарата у ювенилей *Adalaria proxima* после метаморфоза (Thompson, 1958) с изменениями. А – ювениль с хорошо различимыми гладкими ринофорами, глазами, ногой и короткими спикулами в центральной части нотума; Б – спикулы расположены как в центральной части нотума, так и в переходной зоне между центральной и периферической частями нотума, в центральной части тела спикулы ориентированы перпендикулярно передне-задней оси тела, в переходной – вдоль нее; В – наиболее плотное скопление спикул образуется в переходной зоне нотума, первые спикулы появляются в периферической части нотума; Г – плотность спикул в центральной и переходной частях нотума увеличивается, происходит увеличение числа спикул в периферической части нотума, появляются папиллы, однако спикулы в них не детектируются; Д – увеличивается плотность расположения спикул в нотуме, появляются спикулы в папиллах; Е – внешняя морфология спикул тела. Обозначения: гл – глаза; н – нотум; нг – нога; п – папиллы; пзн – переходная зона нотума; пчн – периферическая часть нотума; рф – ринофоры; с – спикула; цчн – центральная часть нотума. Масштаб: А, Б – 0,1 мм; В – 0,14 мм; Г – 0,2 мм; Д – 0,3 мм.

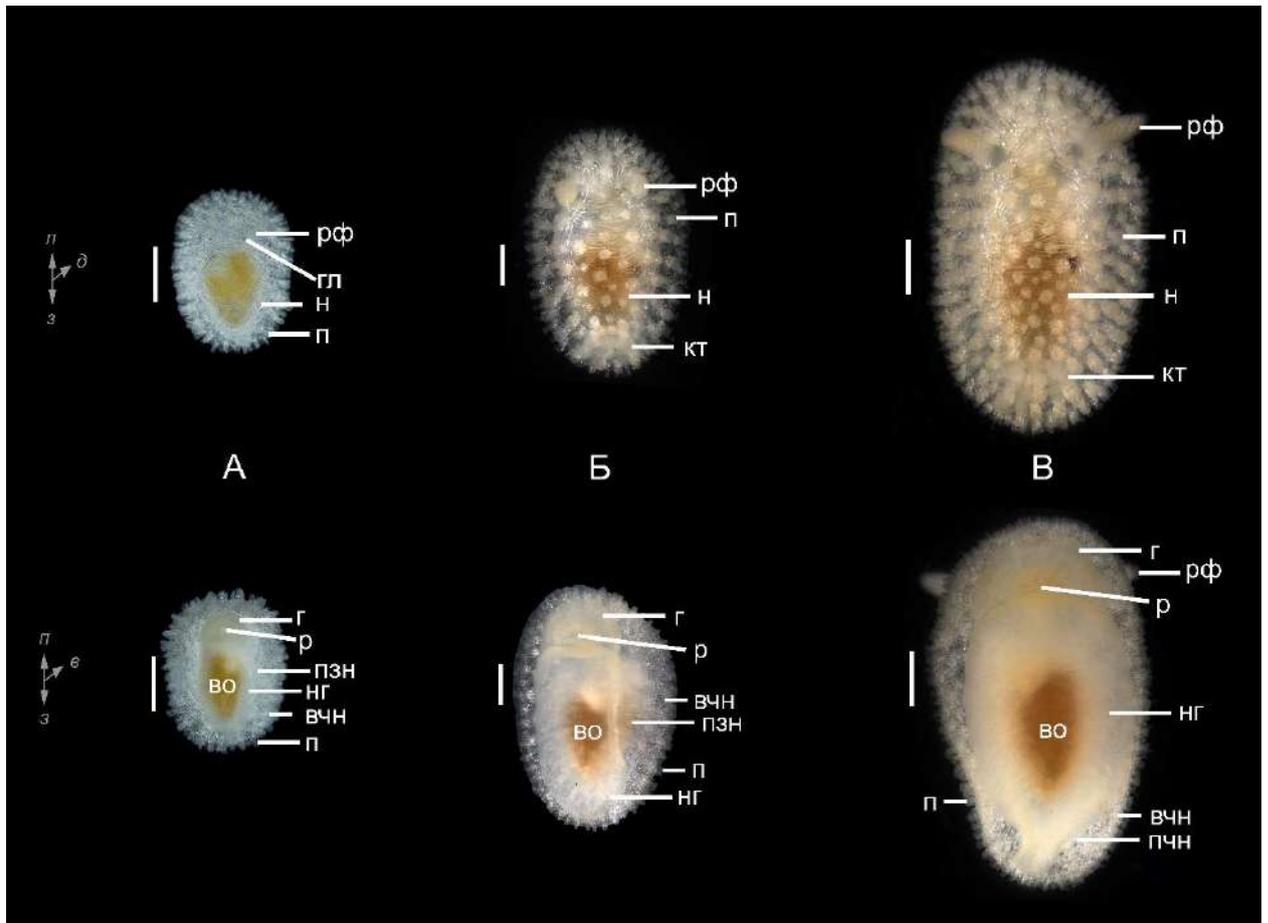


Рисунок 1.7. Внешняя морфология *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза (прижизненные фото). А – первая группа (I) – ювенилы *O. muricata* с гладкими ринофорами и развитыми папиллами; Б – вторая группа (II) – неполовозрелые *O. muricata* со складчатыми ринофорами и хорошо различимыми папиллами; В – третья группа (III) – половозрелые *O. muricata* со складчатыми ринофорами и хорошо различимыми папиллами. Верхний ряд – вид с дорсальной стороны, нижний – с вентральной стороны. Обозначения: во – внутренние органы; вчн – вентральная часть нотума; г – голова; гл – глаз; кт – ктений; н – нотум; нг – нога; п – папиллы; пзн – переходная зона нотума; р – рот; рф – ринофоры; с – спикула. Обозначение осей: в – вентральная; д – дорсальная; з – задняя; п – передняя. Масштаб: А – 100 мкм; Б – 500 мкм; В – 2 мм.

8.2.2 Иллюстративный материал к главе «Результаты»

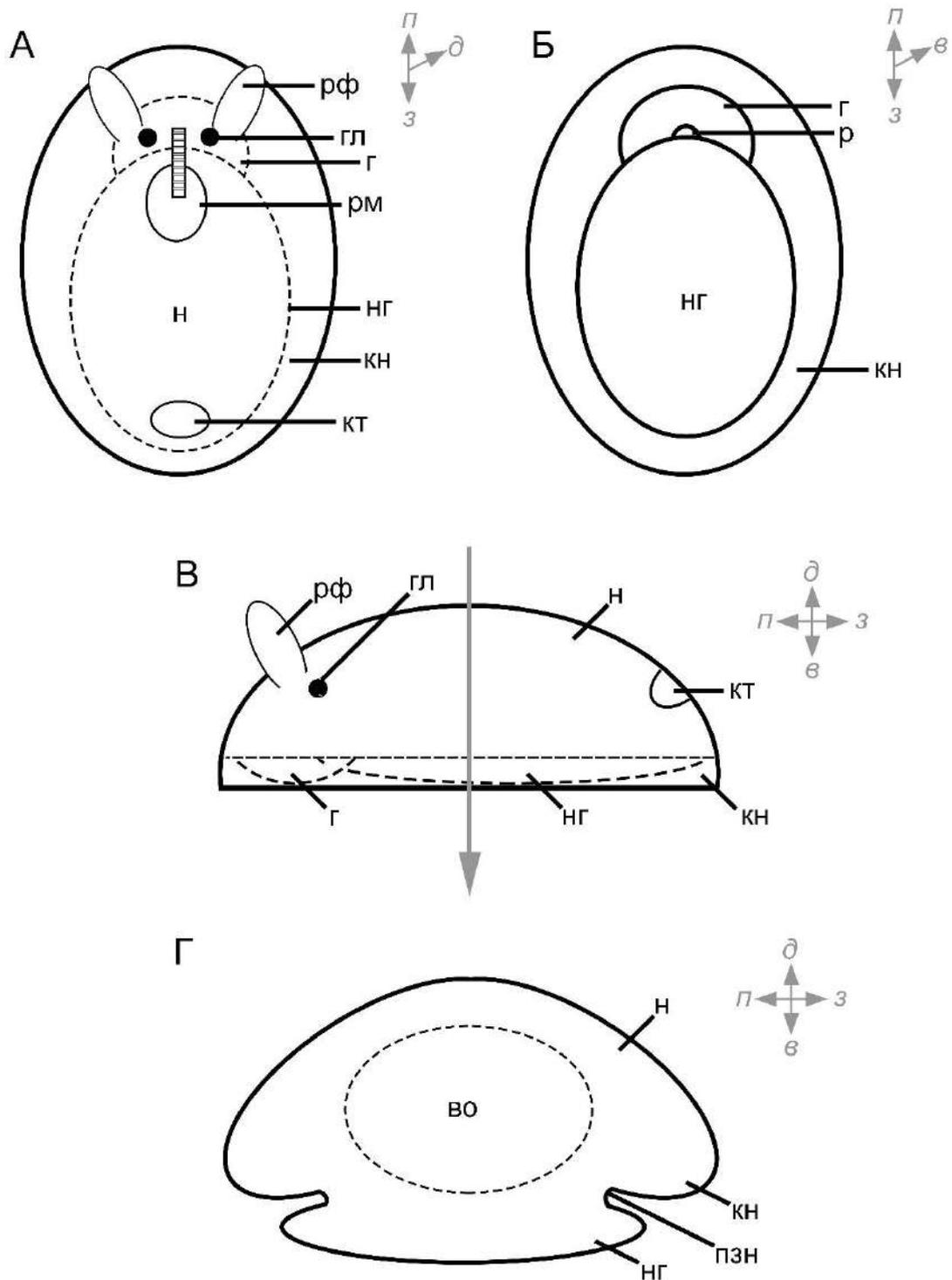


Рисунок 3.1. Общая схема строения тела *Onchidoris muricata* (папиллы не изображены). А – вид на нотум с дорсальной стороны; Б – вид на ногу и край нотума с вентральной стороны; В – вид сбоку (серая стрелка – середина тела); Г – поперечный срез через середину тела. Обозначения: во – внутренние органы; г – голова; гл – глаз; кн – край нотума; кт – ктенидий; нг – нога; н – нотум; пзн – переходная зона нотума; р – рот; рм – радулярный мешок; рф – ринофор. Обозначение осей: в – вентральная; д – дорсальная; з – задняя; п – передняя.

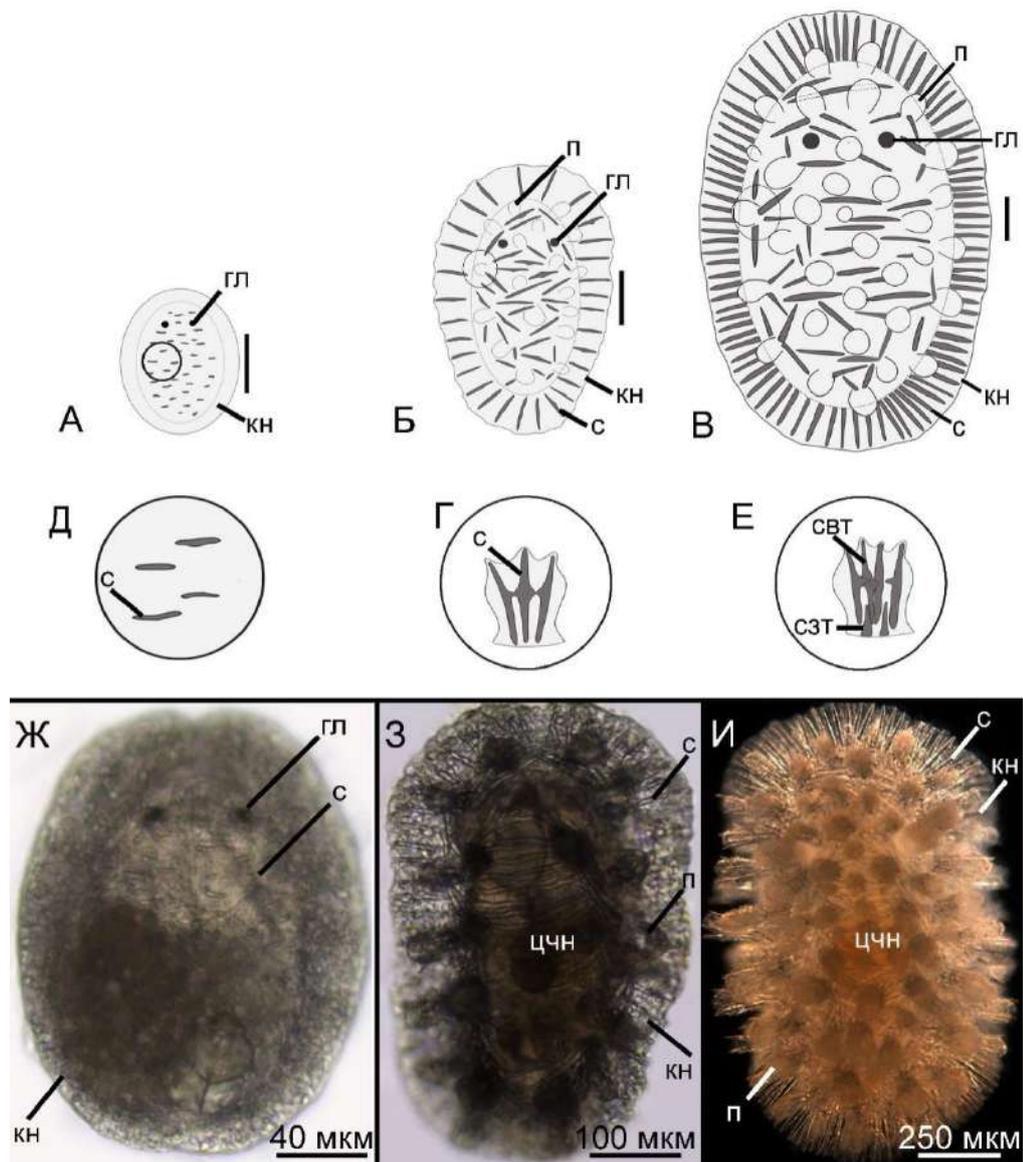


Рисунок 3.2. Преобразование спикульного комплекса в нотуме ювенилей *Onchidoris muricata* (I группа). А – схема *O. muricata* длиной 200 мкм. Папиллы не развиты, короткие и широкие спикулы на дорсальной стороне нотума располагаются перпендикулярно переднезадней оси тела, параллельно друг другу, спикулы края нотума округлые; Б – схема особи длиной 500 мкм, в развитых папиллах различим один слой спикул, вытянутые спикулы расположены хаотично в центральной части тела на значительном расстоянии друг от друга и ориентированы перпендикулярно краю нотума; В – схема *O. muricata* длиной 1 мм; спикулы параллельны друг другу в центральной части нотума, подобно горизонтальному тракту взрослых особей; радиально расположенные спикулы начинают образовывать звездчатый тракт под папиллой; в краевой части нотума спикулы расположены аналогично образцу длиной 500 мкм, но более плотно; Д – схема расположения спикул в дорсальной части нотума у особи длиной 200 мкм; Г – спикулы образуют розетку в папилле *O. muricata*, длина тела которого 500 мкм; Е – спикулы формируют вертикальный тракт в папиллах *O. muricata* длиной 1 мм, в основании папиллы расположены концы спикул звездчатого тракта; Ж–И – фотографии образцов *O. muricata* длиной 200 мкм, 500 мкм и 1 мм с полупрозрачными покровами и просвечивающими спикулами (световая микроскопия). Обозначения: гл – глаза; зт – звездчатый тракт; кн – край нотума; п – папиллы; с – спикулы; свт – спикулы вертикального тракта; сзт – спикулы звездчатого тракта; цчн – центральная часть нотума; Масштаб: А, Б, В – 100 мкм.

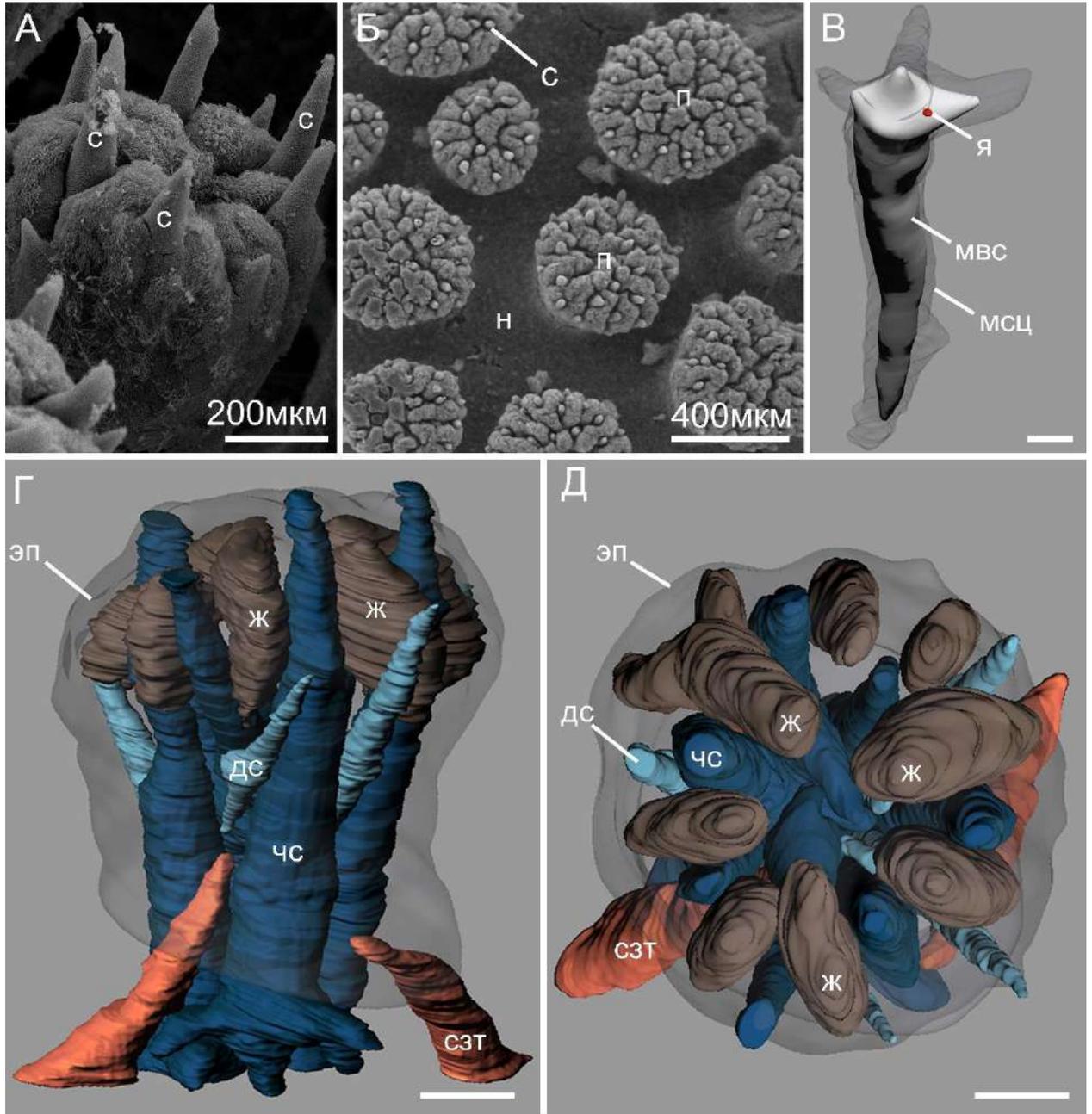


Рисунок 3.3. Морфология папиллы *Onchidoris muricata* (А–Б – СЭМ; В–Д – трехмерная реконструкция). А – внешняя морфология апикальной части папиллы со спикулами; Б – внешний вид на папиллы, вид сверху; В – морфология склероцита четырехосной спикулы; Г, Д – особенности расположения спикул вертикального тракта в папилле (Г – вид сбоку; Д – вид сверху). Обозначения: дс – двуосная спикула; ж – субэпидермальна железа папиллы; мвс – мембрана вакуоли склероцита; мсц – мембрана склероцита; н – нотум; п – папилла; с – спикула; сзт – спикула звездчатого тракта; чс – четырехосная спикула; эп – эпителий папиллы; я – ядро. Масштаб: В – 100 мкм; Г, Д – 200 мкм

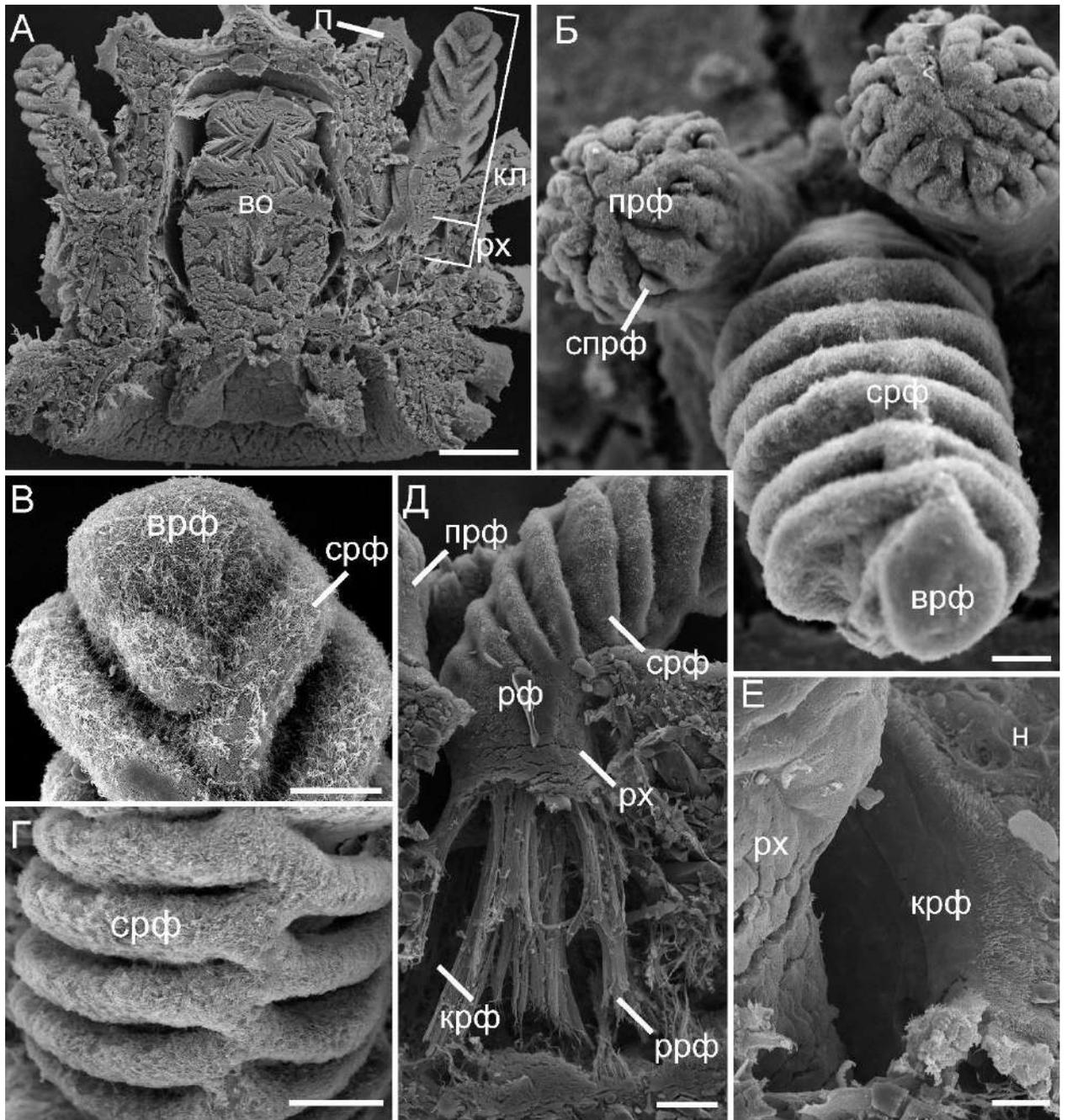


Рисунок 3.4. Общая морфология ринофора *Onchidoris muricata* (СЭМ). А – поперечный срез через передний конец тела; Б – ринофор с папиллами, окружающими его, вид сверху; В – верхушка ринофора; Г – складки ринофора; Д – мышцы ретракторы ринофора; Е – карман ринофора. Обозначения: во – внутренние органы; врф – верхушка ринофора; кл – клавус; крф – карман ринофора; н – нотум; прф – папиллы ринофора ррф – ретракторы ринофора; рх – рахис; спрф – спикулы папиллы ринофора; срф – складки ринофора. Масштаб: А – 250 мкм; Б – 50 мкм; В – 2 мкм; Г – 100 мкм; Д – 100 мкм; Е – 25 мкм.

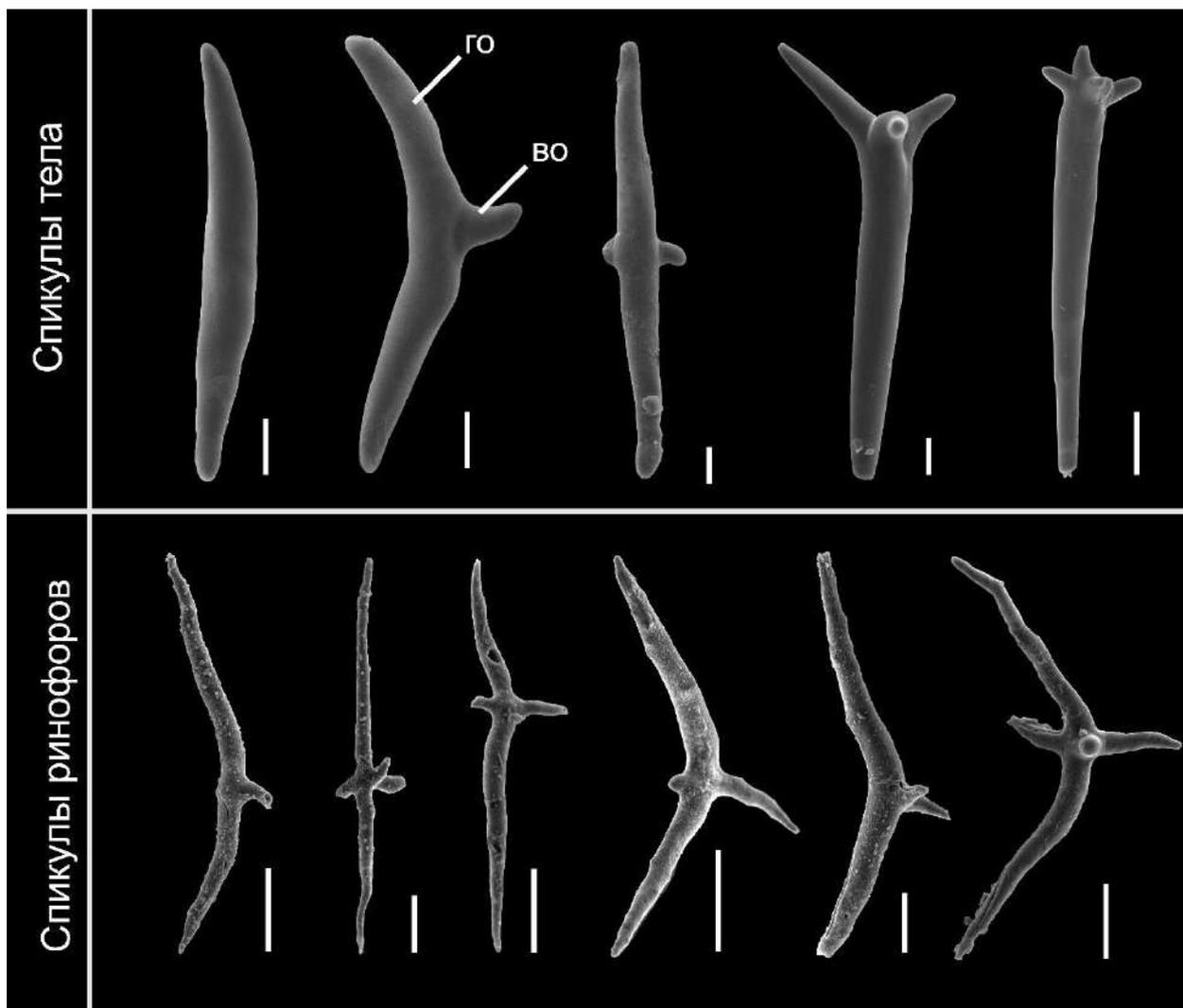


Рисунок 3.5. Внешняя морфология отдельных спикул тела и ринофоров половозрелой особи *Onchidoris muricata* (СЭМ). Обозначения: во – вторичная ось спикулы; го – главная ось. Масштаб: 30 мкм.

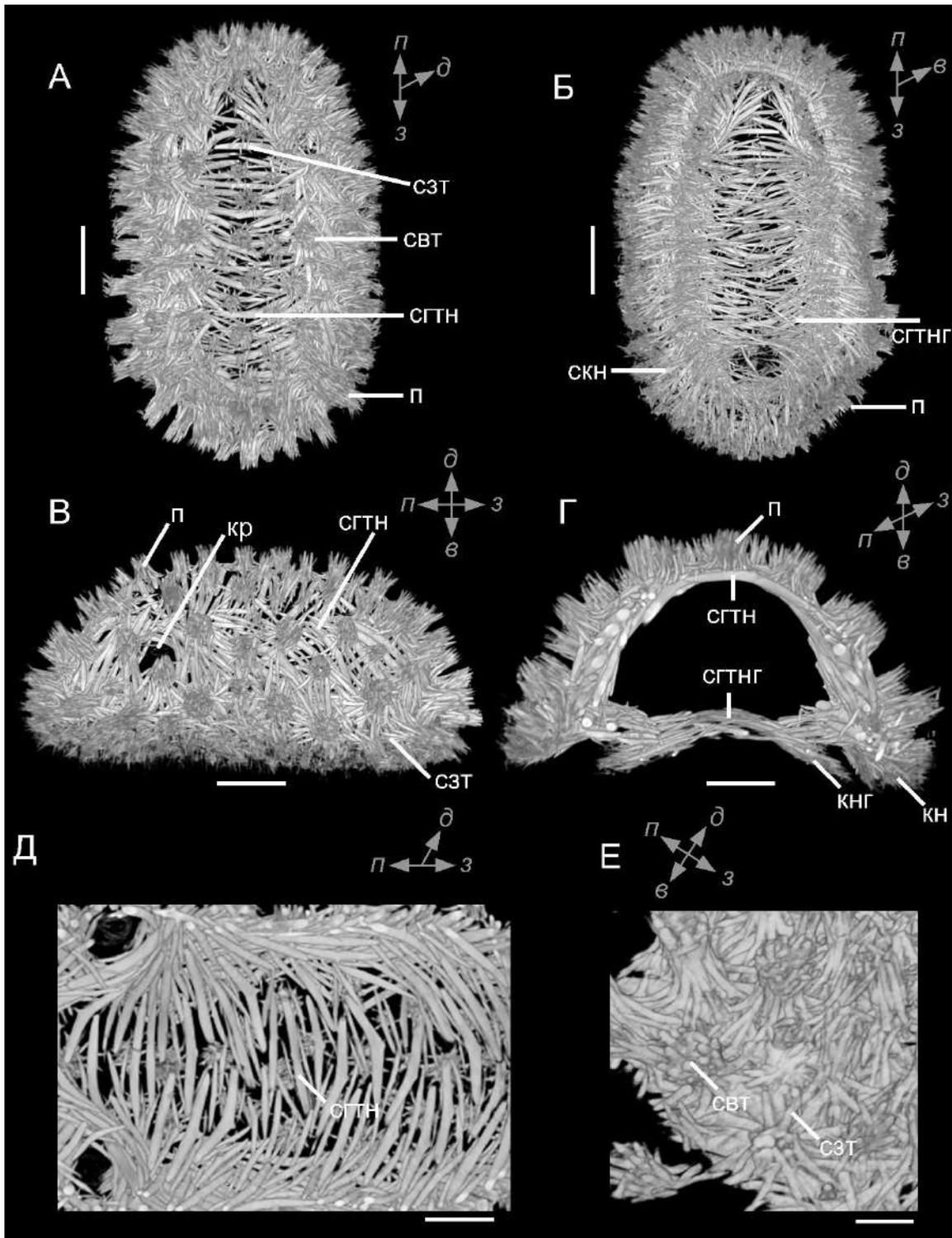


Рисунок 3.6. Строение спикульного комплекса неполовозрелых особей *Onchidoris muricata* (микроКТ). А, Б, В – общий план строения (А – вид с дорсальной стороны; Б – вид с вентральной стороны; В – вид сбоку); Г – поперечный оптический срез через центральную часть нотума (вид спереди); Д – фрагмент спикульной сети нотума и папилл (вид сверху); Е – звездчатый и вертикальные тракты. Обозначения: кн – край нотума; кнг – край ноги; крф – карман ринофора; п – папилла; свт – спикулы вертикального тракта; сзт – спикулы звездчатого тракта; скн -спикулы края нотума; сгтн – спикулы горизонтального тракта нотума; сгтнг – спикулы горизонтального тракта ноги. Обозначение осей: в – вентральная; д – дорсальная; з – задняя; п – передняя. Масштаб: А, Б – 600 мкм; В – 800 мкм; Г – 380 мкм; Д – 350 мкм; Е – 250 мкм.

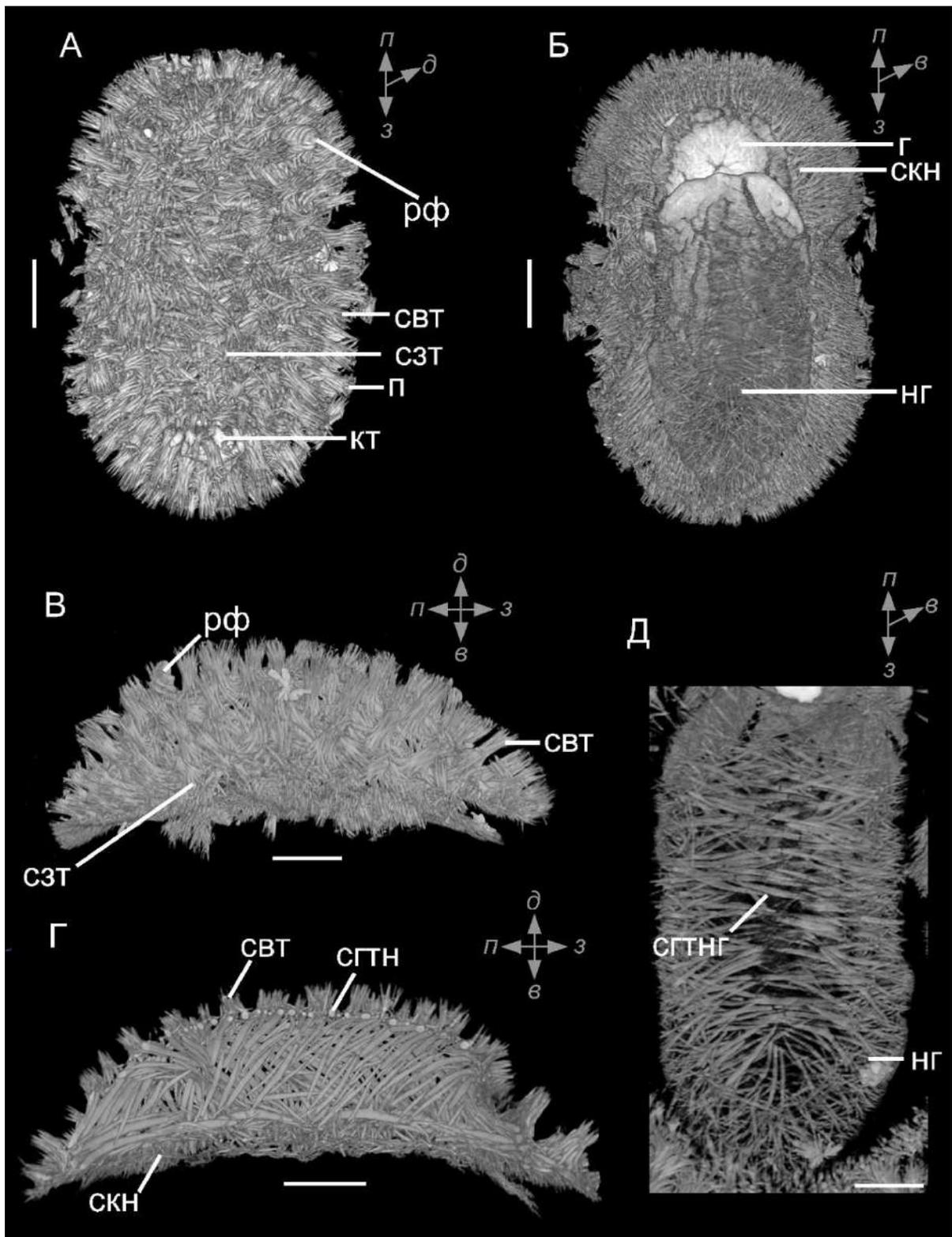


Рисунок 3.7. Строение спикульного комплекса половозрелых особей *Onchidoris muricata* (микроКТ). А, Б, В – общий план строения (А – вид с дорсальной стороны; Б – вид с вентральной стороны; В – вид сбоку); Г – продольный оптический срез через правую сторону нотума (вид изнутри тела); Д – фрагмент спикульной сети ноги. Обозначения: г – голова; кт – ктенидии; нг – нога; п – папилла; рф – ринофоры; свт – спикулы вертикального тракта; сгнт – спикулы горизонтального тракта ноги; сзт – спикулы звездчатого тракта; скн – спикулы края нотума. Обозначение осей: в – вентральная; д – дорсальная; з – задняя; п – передняя. Масштаб: 1мм.

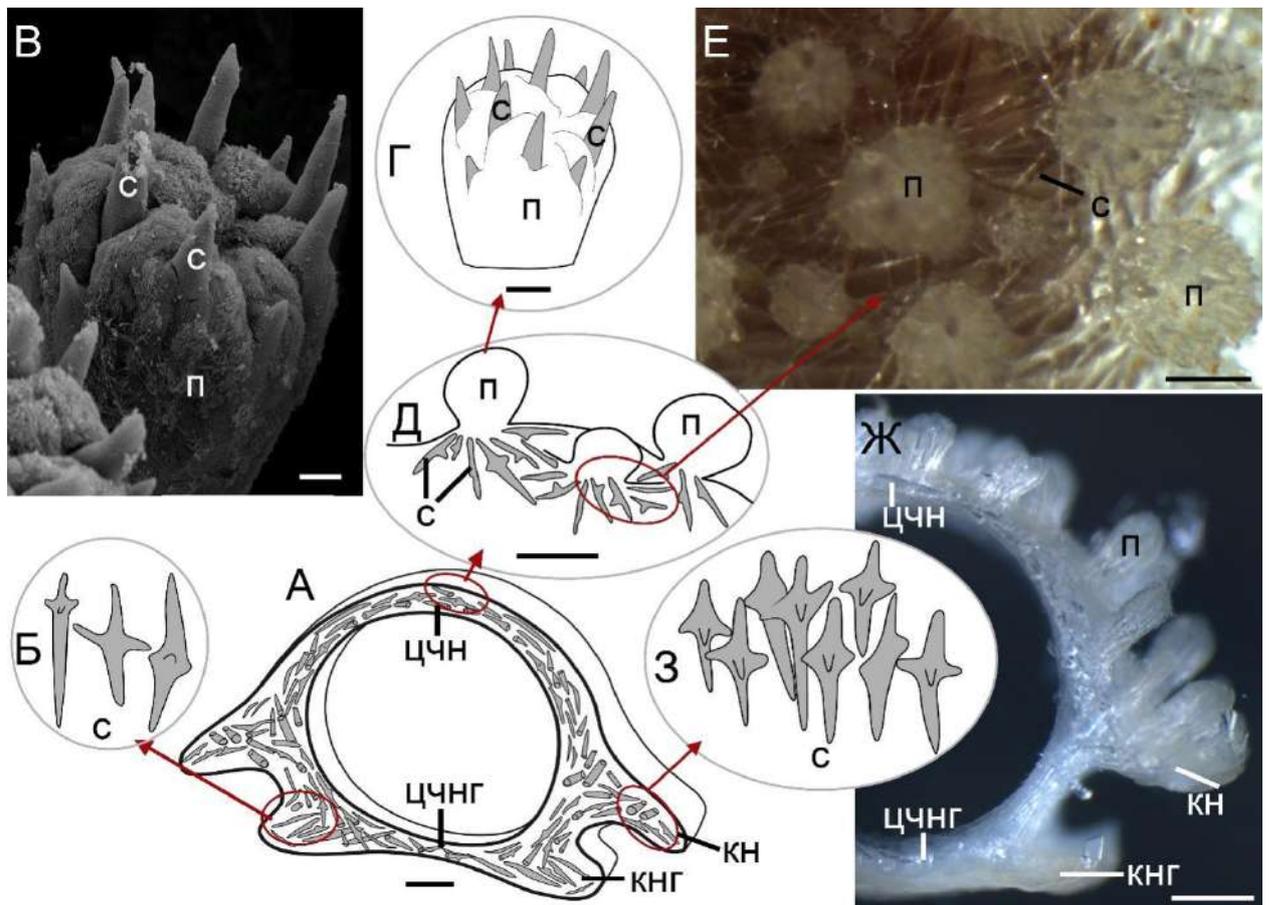


Рисунок 3.8. Организация спикульного комплекса в центральной части тела неполовозрелых и половозрелых особей *Onchidoris muricata*. А – схема строения горизонтальных трактов ноги и нотума, спикулы расположены равномерно на протяжении всего тракта (как в центральной части, так и периферической); Б – внешняя морфология преобладающих типов спикул; В – внешний вид папиллы с выступающими субэпидермальными спикулами (СЭМ); Г – схема папиллы со спикулами; Д – схема взаимного расположения спикул в звездчатом тракте (вид сбоку); Е – спикулы звездчатого тракта в основании папилл (прижизненное фото, вид с дорсальной стороны); Ж – поперечный срез середины тела со спикулами (световая микроскопия); З – схема расположения спикул в краевой зоне нотума. Обозначения: кн – край нотума; кнг – край ноги; п – папилла; с – спикула; цчн – центральная часть нотума; цчнг – центральная часть ноги. Масштаб: А, Г–Е – 100 мкм; В – 50 мкм; Ж – 200 мкм.

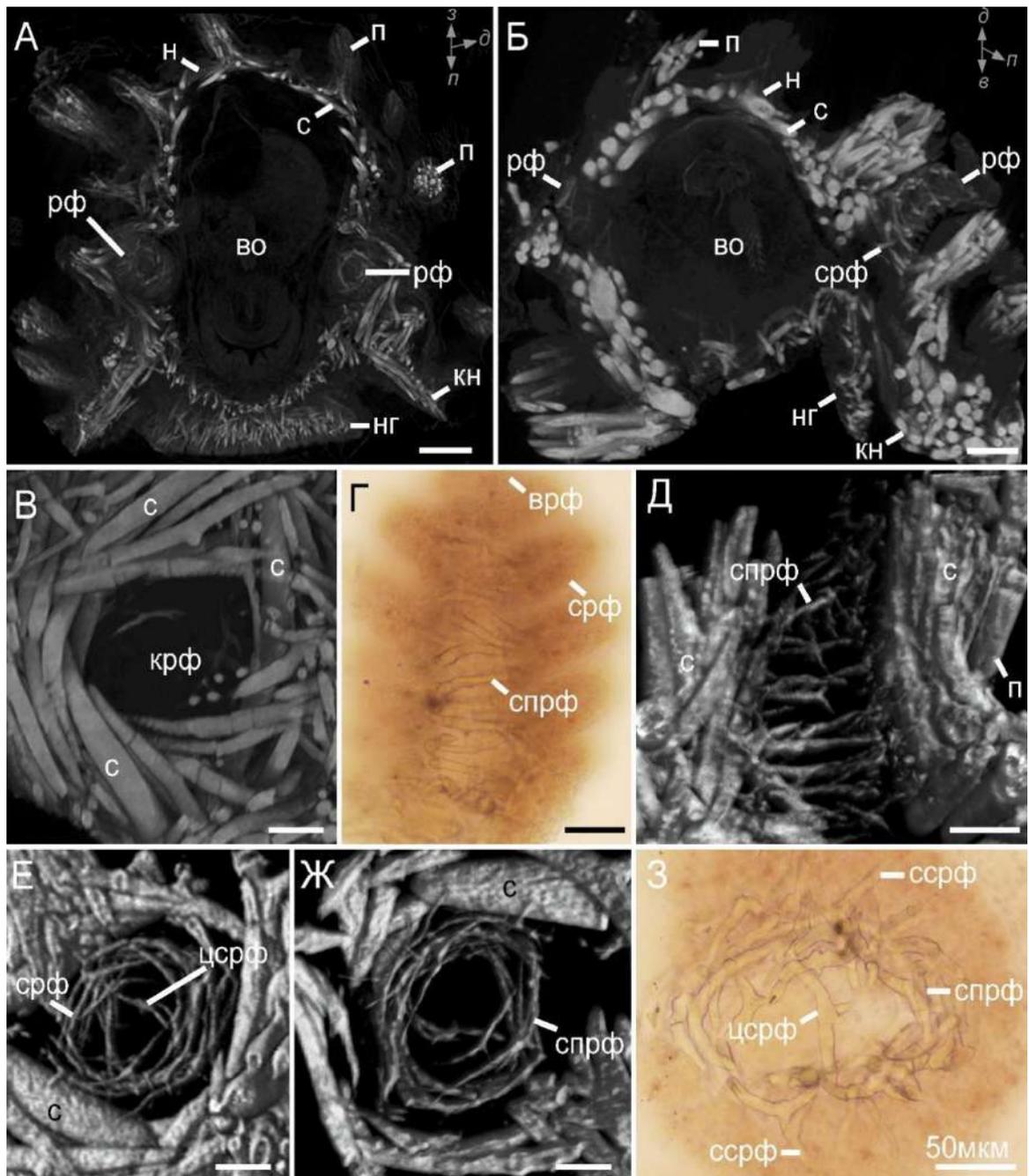


Рисунок 3.9. Морфология спикульного комплекса ринофора *Onchidoris muricata* (микроКТ; Г, З – световая микроскопия). А – спикульный комплекс ринофоров, вид сверху (фронтальный оптический срез передней части тела); Б – спикульная сеть ринофоров, вид сбоку (поперечный оптический срез передней части тела), ринофоры окружены двумя папиллами; В – спикулы нотума, ограничивающие карман ринофора (вид сверху); Г – спикулы ринофора расположены параллельно друг под другом (вид сбоку); Д – спикульная сеть ринофора в окружении спикул папилл (вид сбоку); Е, З – поперечный срез ринофора в базальной части, спикулы ринофора расположены по окружности, при этом расположение спикул не последовательное, а с перекрытием, в центральной части имеется спикула, которая ориентирована поперек ринофора; Ж – оптический поперечный срез ринофора в средней части. Обозначения: во – внутренние органы; кн – край нотума; крф – карман ринофора; н – нотум; нг – нога; п – папилла; рф – ринофоры; с – спикула; срф – складка ринофора; спрф – спикулы ринофора; ссрф – спикулы складки ринофора; цсрф – центральная спикула ринофора. Обозначение осей: в – вентральная; д – дорсальная; з – задняя; п – передняя.

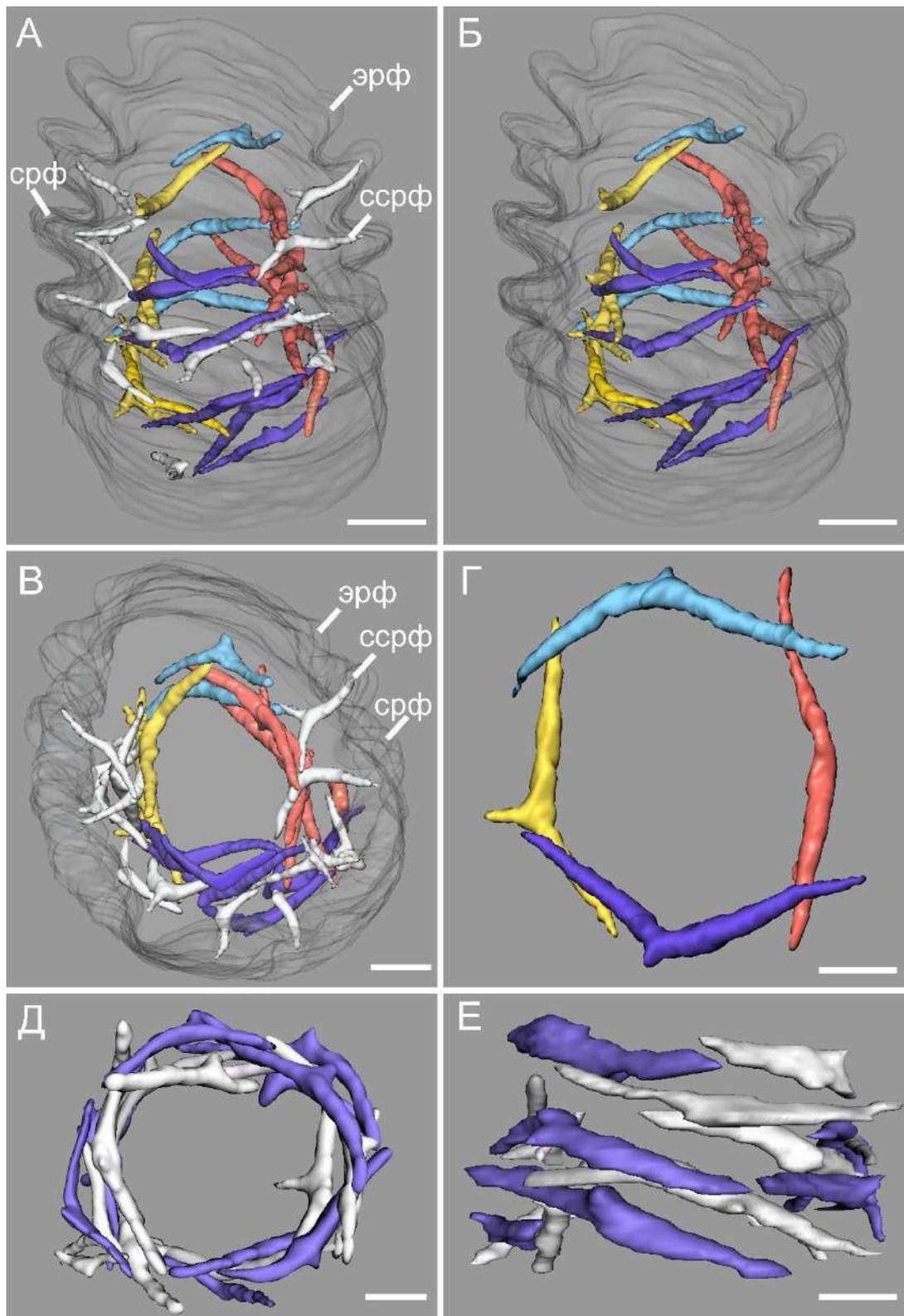


Рисунок 3.10. Фрагмент спикульной сети ринофора *Onchidoris muricata* (трехмерная реконструкция). А–Г – расслабленный ринофор; Д–Е – втянутый ринофор. А – общая морфология колодце-образной спикульной сети; Б – каркас спикульной сети без спикул складок ринофора; В – общий вид сети, вид с дорсальной стороны; Г – один ряд спикул каркаса колодце-образной сети; Д – общий вид спикульной сети в сокращенном ринофоре, вид с дорсальной стороны; Е – вид сбоку. Обозначения: срф – складка ринофора; ссрф – спикула складки ринофора; эрф – эпителий ринофора.

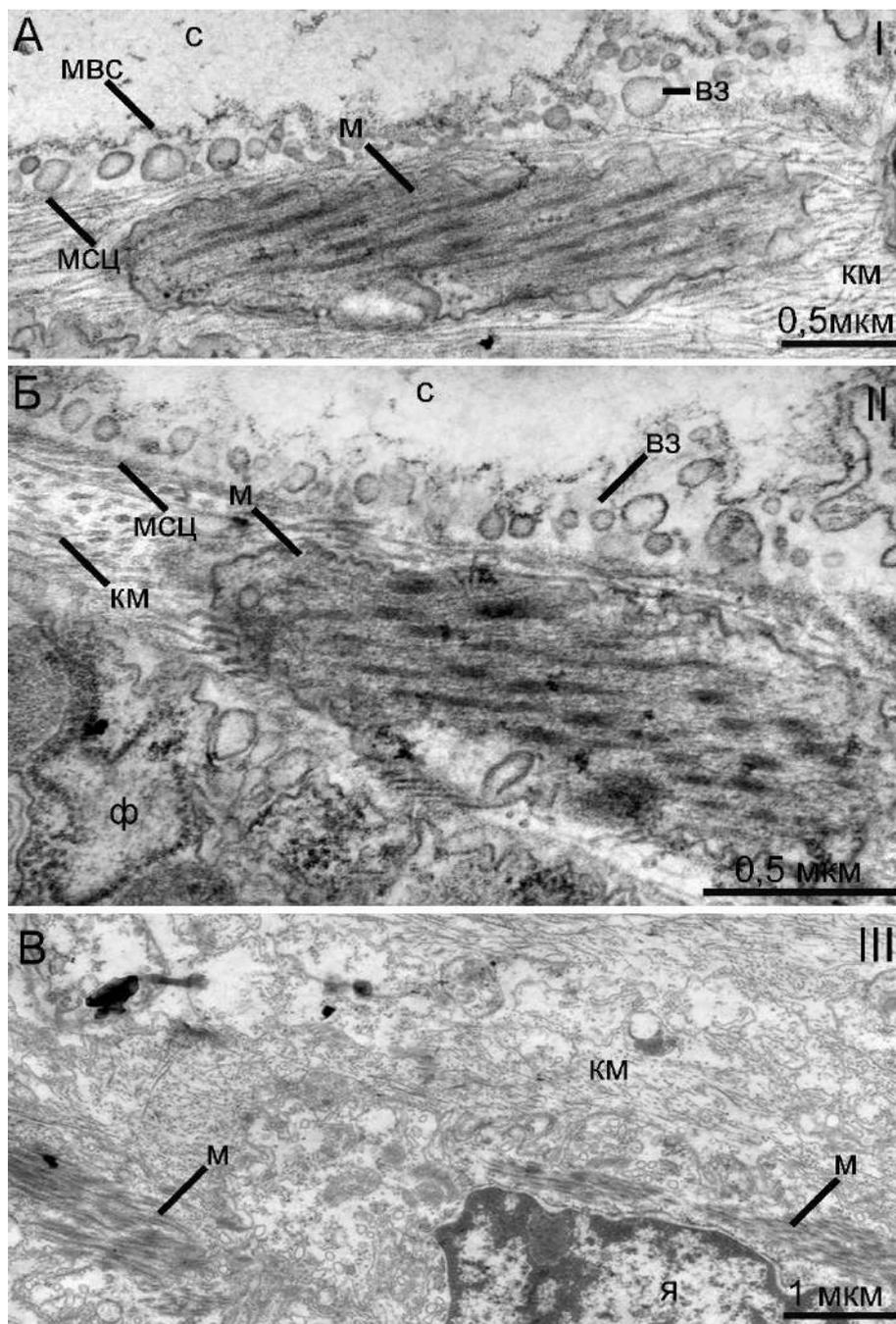


Рисунок 3.11. Особенности ультраструктуры мышечного комплекса нотума трех размерных групп *Onchidoris muricata* (ТЭМ). А – первой (I) размерной группы (ювенили после метаморфоза); Б – второй (II) размерной группы (ювенили); В – третьей (III) размерной группы (половозрелые особи). Обозначения: в3 – везикулы; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мвс – мембрана вакуоли склероцита; мсц – мембрана склероцита; с – спикула; ф – фибробласт; я – ядро.

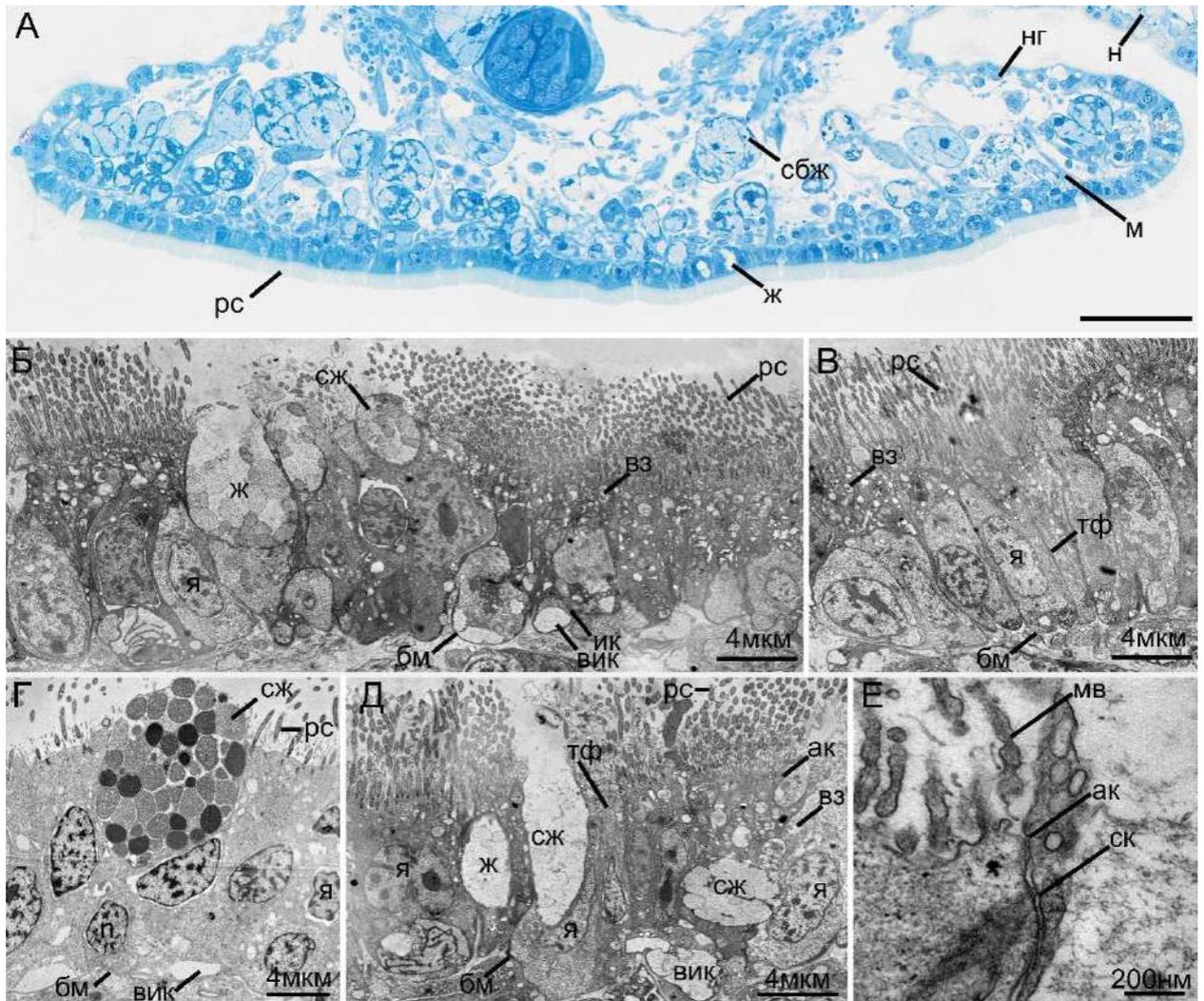


Рисунок 3.13. Особенности морфологии эпителия ноги *Onchidoris muricata* (А – гистология, световая микроскопия; Б–Е – ТЭМ). А – общий вид ноги с эпителиальными и субэпидермальными железами (поперечный срез). Б, В – столбчатый мультицилиарный эпителий ноги с эпителиальными гранулированными железами и Икс клетками в базальной части; Г – эпителиальная железа с гранулированным секретом; Д – высвобождение секрета эпителиальной железы; Е – адгезивные и септированные клеточные контакты. Обозначения: ак – адгезивные контакты; бм – базальная мембрана; вз – везикула; вик – вакуоль Икс клетки с мелкозернистым содержимым; ж – эпителиальная железа; ик – Икс клетка; м – мышцы; мв – микровилли; н – нотум; нг – нога; рс – реснички; сбж – субэпидермальна железа; сж – секрет железы; ск – септированные контакты; я – ядро. Масштаб: А – 300 мкм.

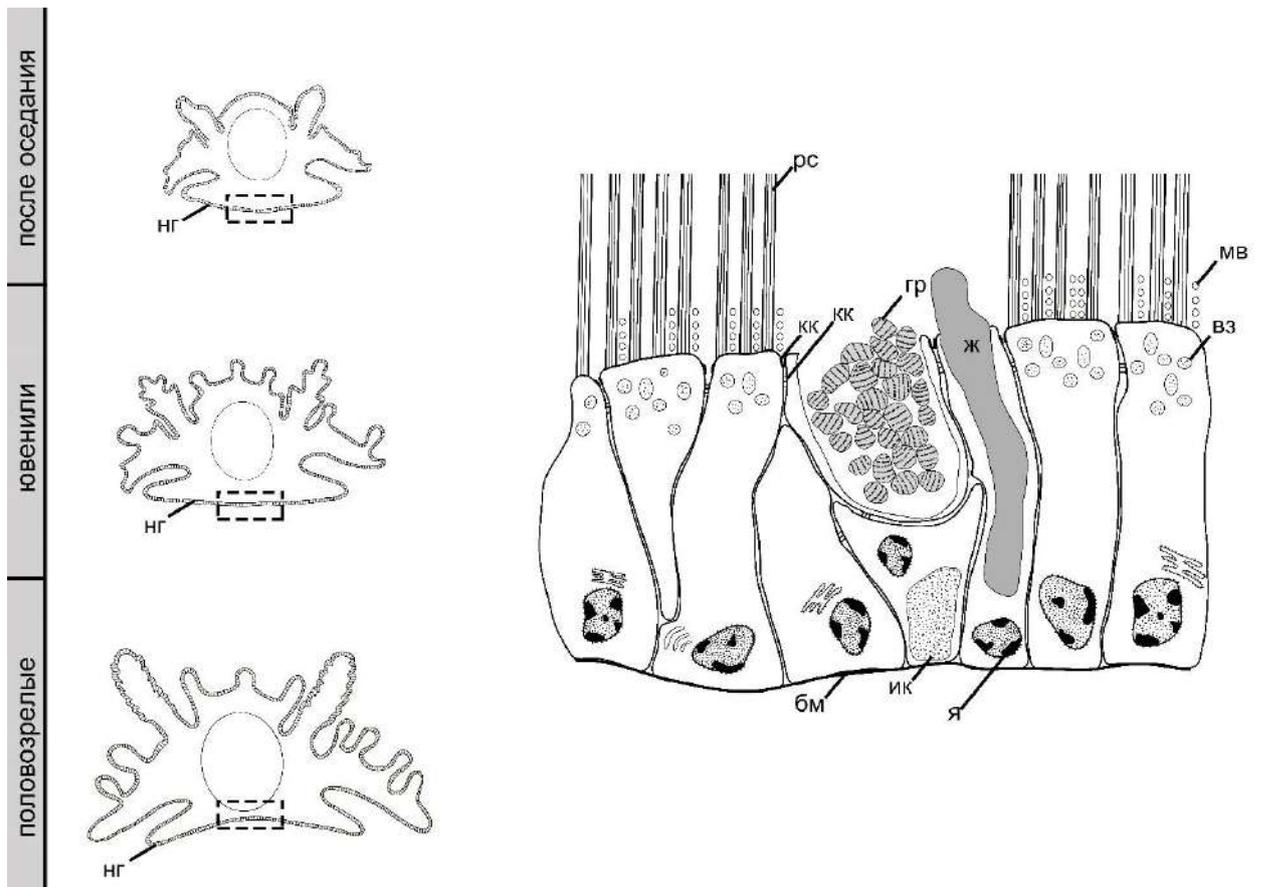


Рисунок 3.14. Схема строения эпителия ноги *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза. Обозначения: бм – базальная мембрана; вз – везикулы; гр – гранулы; ж – железа; ик – Икс клетка; кк – клеточные контакты; мв – микровилли; нг – нога; рс – реснички; я – ядро.

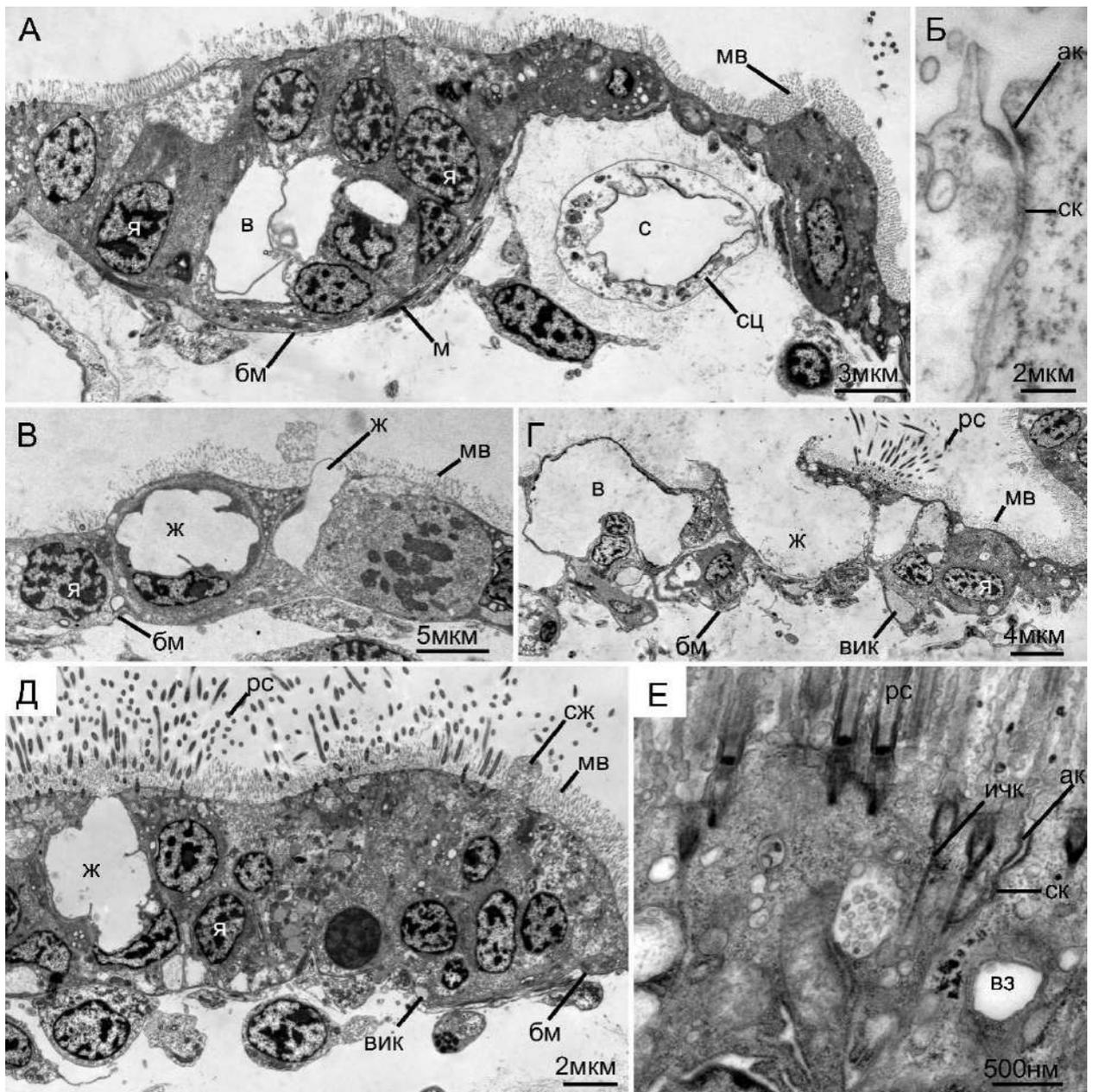


Рисунок 3.15. Особенности ультраструктуры эпителия папиллы *Onchidoris muricata* (ТЭМ). А – эпителий апикальной части папиллы со спикулой под ним. Б – адгезивные и септированные клеточные контакты; В – эпителиальные железы с гомогенным секретом; Г – эпителиальные железы с крупной вакуолью и апокриновым типом секреции; Д – мультицилиарные клетки, окружающие железы; Е – исчерщенные корешки мультицилиарных клеток. Обозначения: ак – адгезивные контакты; бм – базальная мембрана; в – вакуоль; вз – везикула; вик – вакуоль Икс клетки с мелкозернистым содержимым; ж – эпителиальная железа; ичк – исчерщенные корешки; м – мышцы; мв – микровилли; рс – реснички; с – спикула; сц – склероцит; сж – секрет железы; ск – септированные контакты; я – ядро.

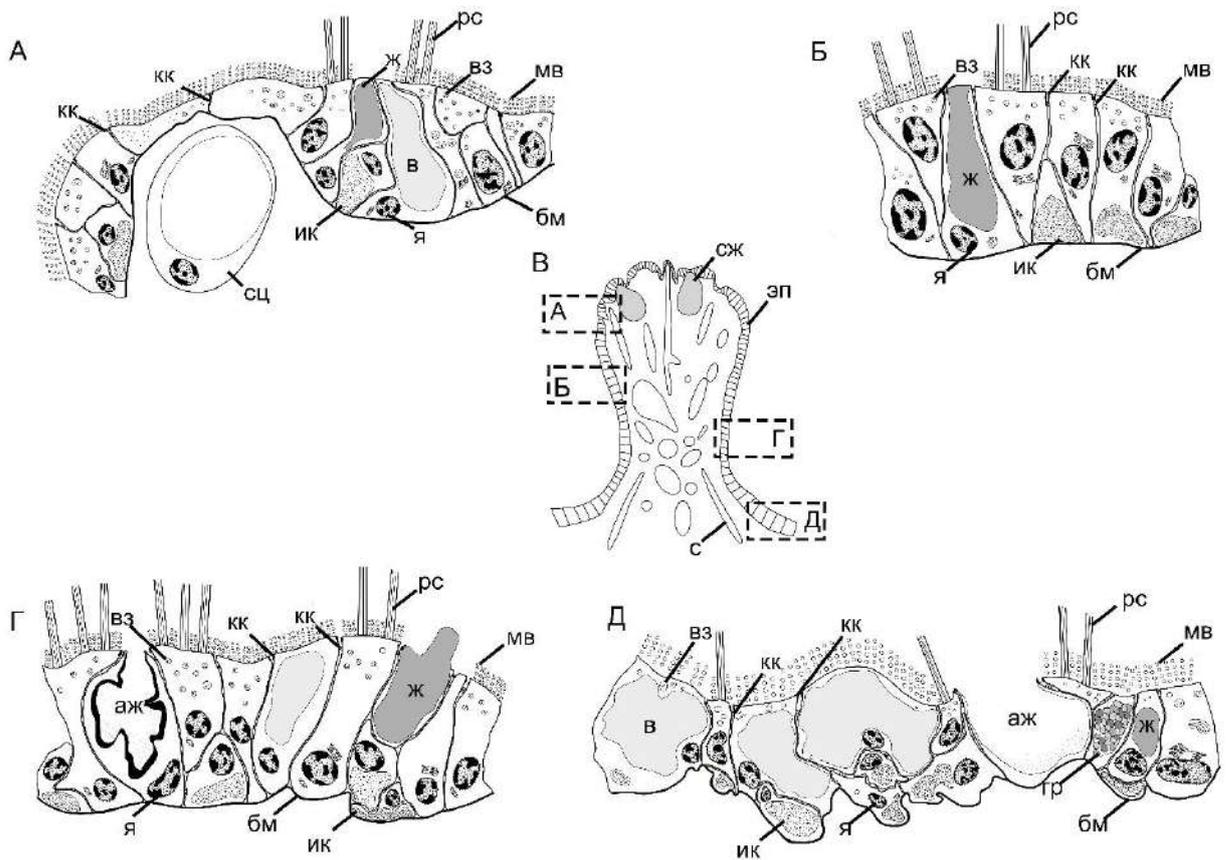


Рисунок 3.16. Схема строения эпителия папиллы *Onchidoris muricata*. А – уплощенный эпителий апикальной части папиллы возле спикул; Б – столбчатый эпителий средней части папиллы; В – общая схема папиллы; Г – эпителий базальной части папиллы; Д – эпителий переходной зоны папиллы в нотум с большим количеством вакуолизированных клеток. Обозначения: аж – апокриновая железа; бм – базальная мембрана; вз – везикула; ж – железа; ик – Икс клетка; кк – клеточные контакты; мв – микровилли; рс – реснички; с – спикула; сж – субэпидермальная железа; сц – склероцит; эп – эпителий; я – ядро.

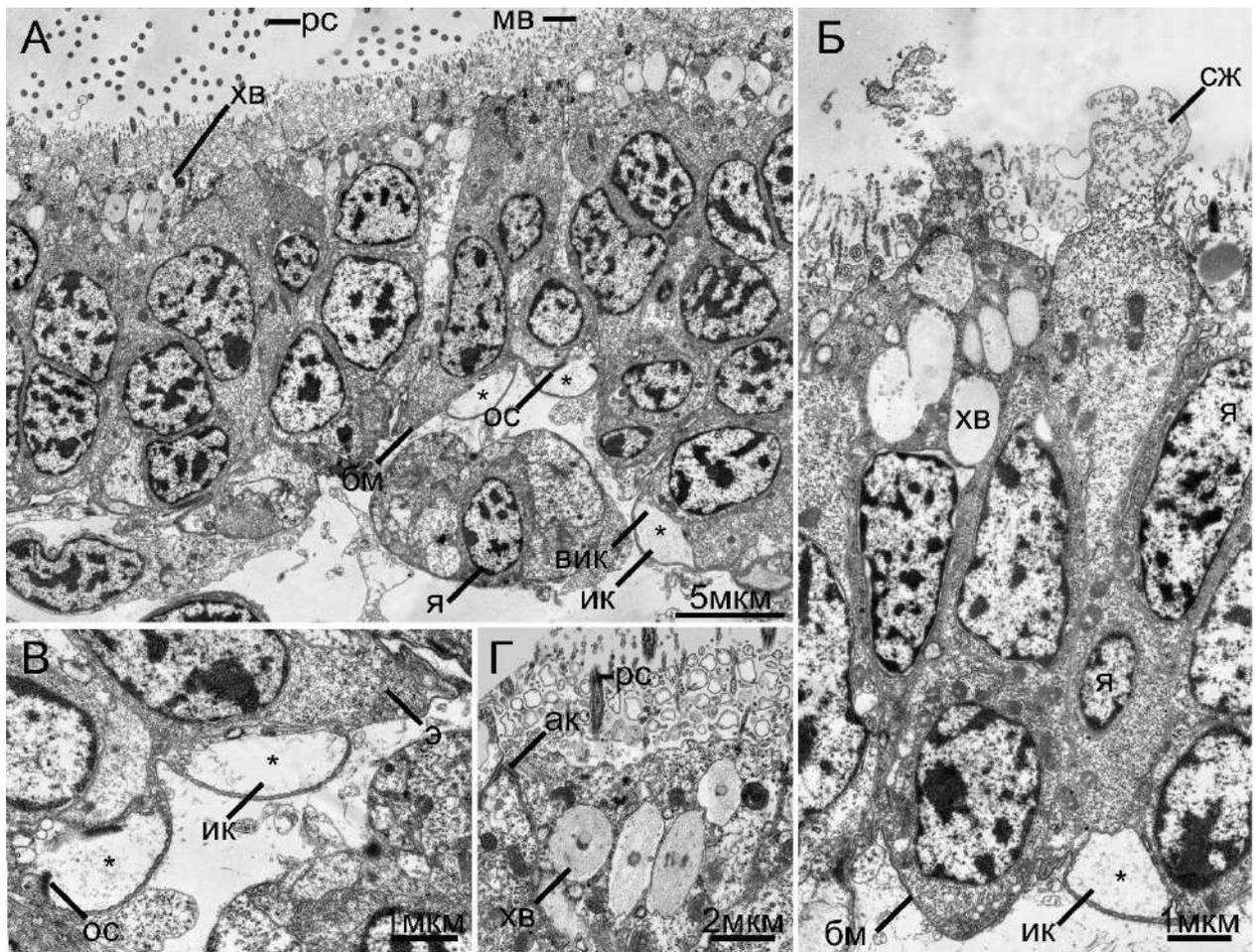


Рисунок 3.17. Особенности ультраструктуры эпителия ринофора ювенили *Onchidoris muricata* (ТЭМ). А – столбчатый эпителий с одним слоем хитиновых веретен в апикальной части клеток; Б – фрагмент эпителия с железистой клеткой; В – Икс клетки в базальной части эпителия; Г – хитиновые веретена в апикальной части клеток. Обозначения: ак – адгезивный контакт; бм – базальная мембрана; вик – вакуоль Икс клетки; ик – Икс клетка; мв – микровилли; ос – осмиофильный слой; сж – секрет железы; pc – реснички; хв – хитиновые веретена; я – ядро.

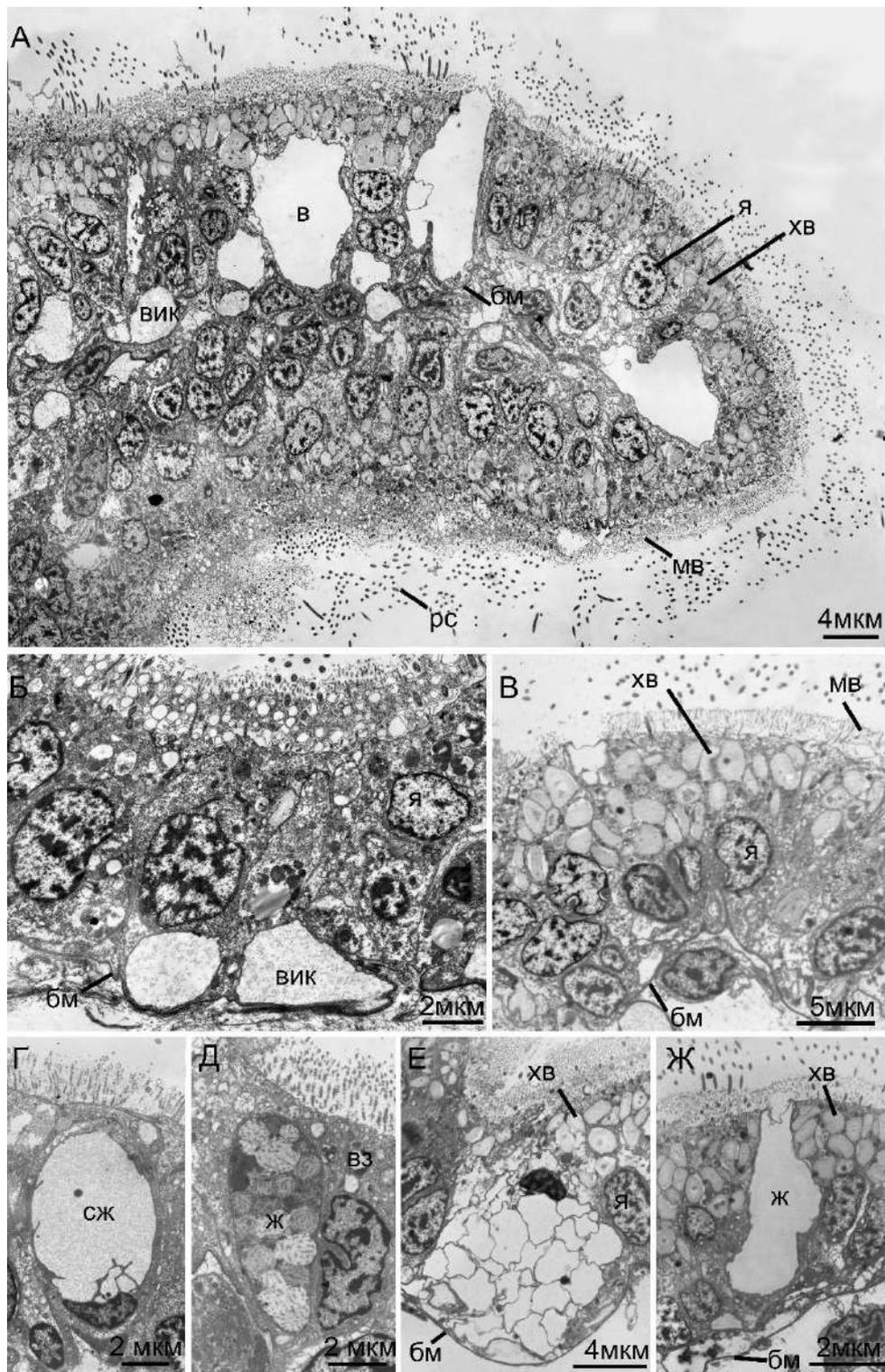


Рисунок 3.18. Особенности ультраструктуры эпителия ринофора половозрелой особи *Onchidoris muricata* (ТЭМ). А – фронтальный срез через складку ринофора; Б – эпителий вентральной стороны складки ринофора без хитиновых веретен в апикальной части клеток и хорошо развитыми Икс клетками – в базальной части; В – эпителий дорсальной стороны складки ринофора с несколькими рядами хитиновых веретен в апикальной части клеток; Г– Ж – разнообразие железистых клеток в эпителии ринофора. Обозначения: бм – базальная мембрана; в – вакуоль; вз – везикула; вик – вакуоль Икс клеток с мелкозернистым содержимым; ж – железа; мв – микровилли; рс – реснички; сж – секрет железы; хв – хитиновые веретена; я – ядро.

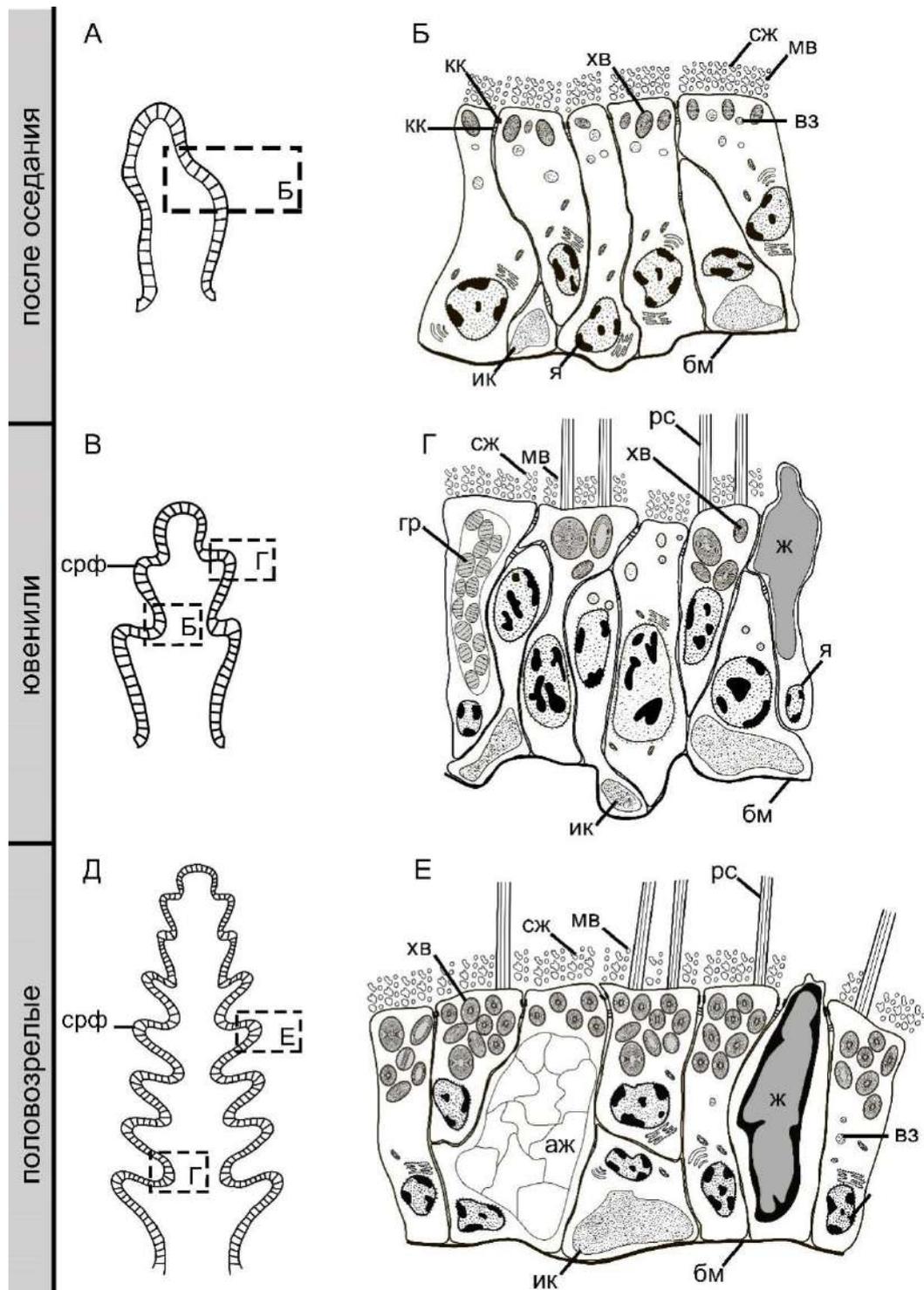


Рисунок 3.19. Схема эпителия ринофора *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза. А – гладкий ринофор, складки ринофора еще не развиты; Б – столбчатый эпителий, слой вакуолей с хитиновыми веретенами еще недоразвит; В – ювенильный ринофор с двумя складками; Г – столбчатый эпителий с развитым железистым компонентом и хитиновыми веретенами в апикальной части клеток, Икс клетки формируют многочисленные впячивания в субэпидермальное пространство; Д – складчатый ринофор половозрелых особей; Е – столбчатый эпителий с развитым железистым компонентом и хитиновыми веретенами в апикальной части клеток. Обозначения: аж – апокринная железа; бм – базальная мембрана; в3 – везикулы; гр – гранулы; ж – железа; ик – Икс клетки; кк – клеточные контакты; мв – микровилли; рс – реснички; сж – секрет желез; хв – хитиновые вакуоли; я – ядро.

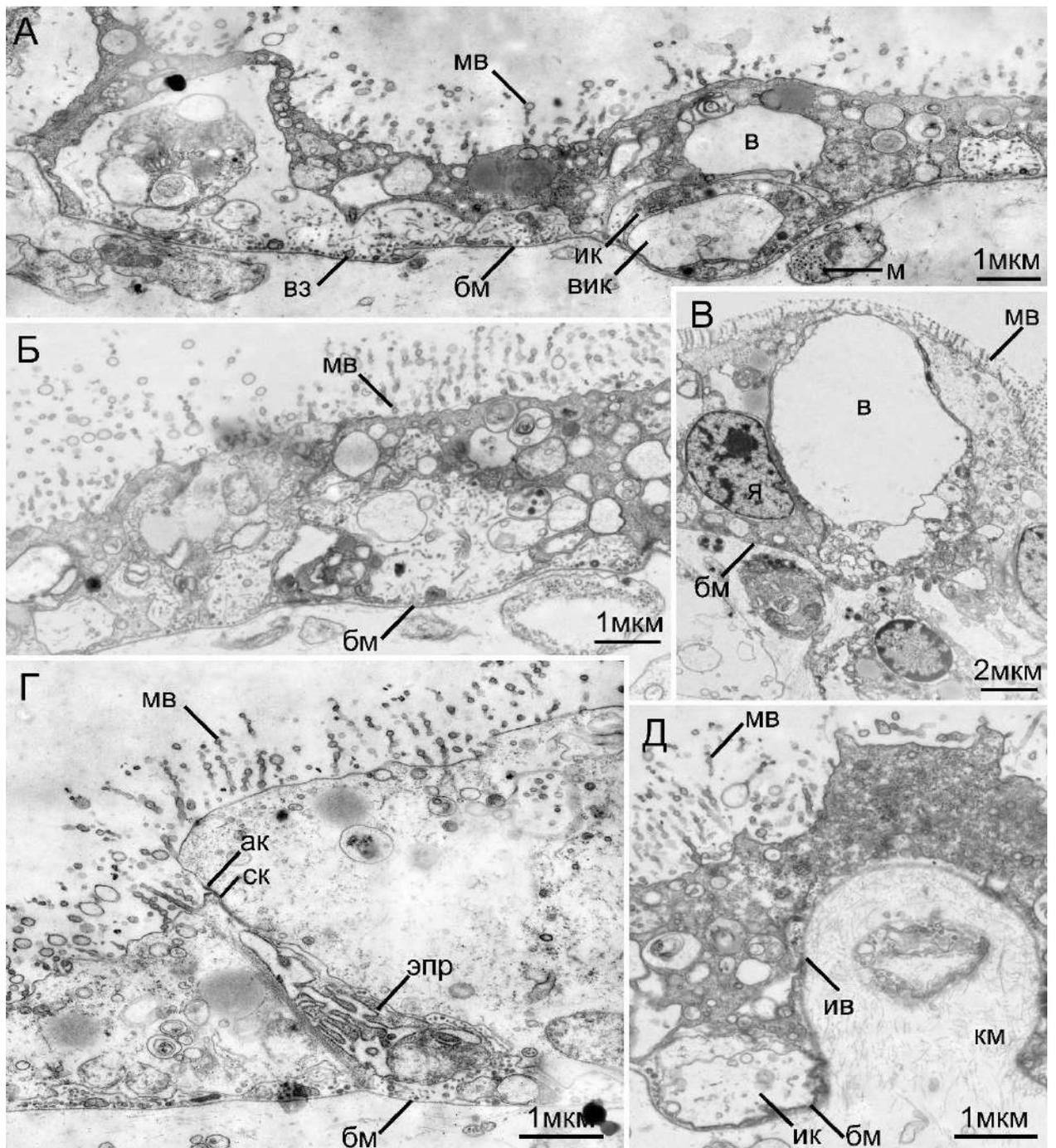


Рисунок 3.20. Особенности ультраструктуры эпителия нотума ранней ювенили *Onchidoris turicata* (длина особи 200 мкм; ТЭМ). А, Б – фрагмент рыхлого эпителия с большими межклеточными промежутками, заполненными многочисленными включениями; В – эпителиальная железа с крупной вакуолью и электронно-прозрачным содержимым; Г – поддерживающая эпителиальная клетка с развитым эндоплазматическим ретикуломом и тонофиламентами; Д – инвагинация эпителия, образование компартамента с коллагеновыми волокнами и клетки с вакуолью. Обозначения: ак – адгезивные контакты; бм – базальная мембрана; в – вакуоль; в3 – везикула; вик – вакуоль Икс клетки; ив – инвагинация эпителия; ик – Икс клетка; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мв – микровилли; рс – реснички; ск – септированные контакты; эпр – эндоплазматический ретикулум; я – ядро.

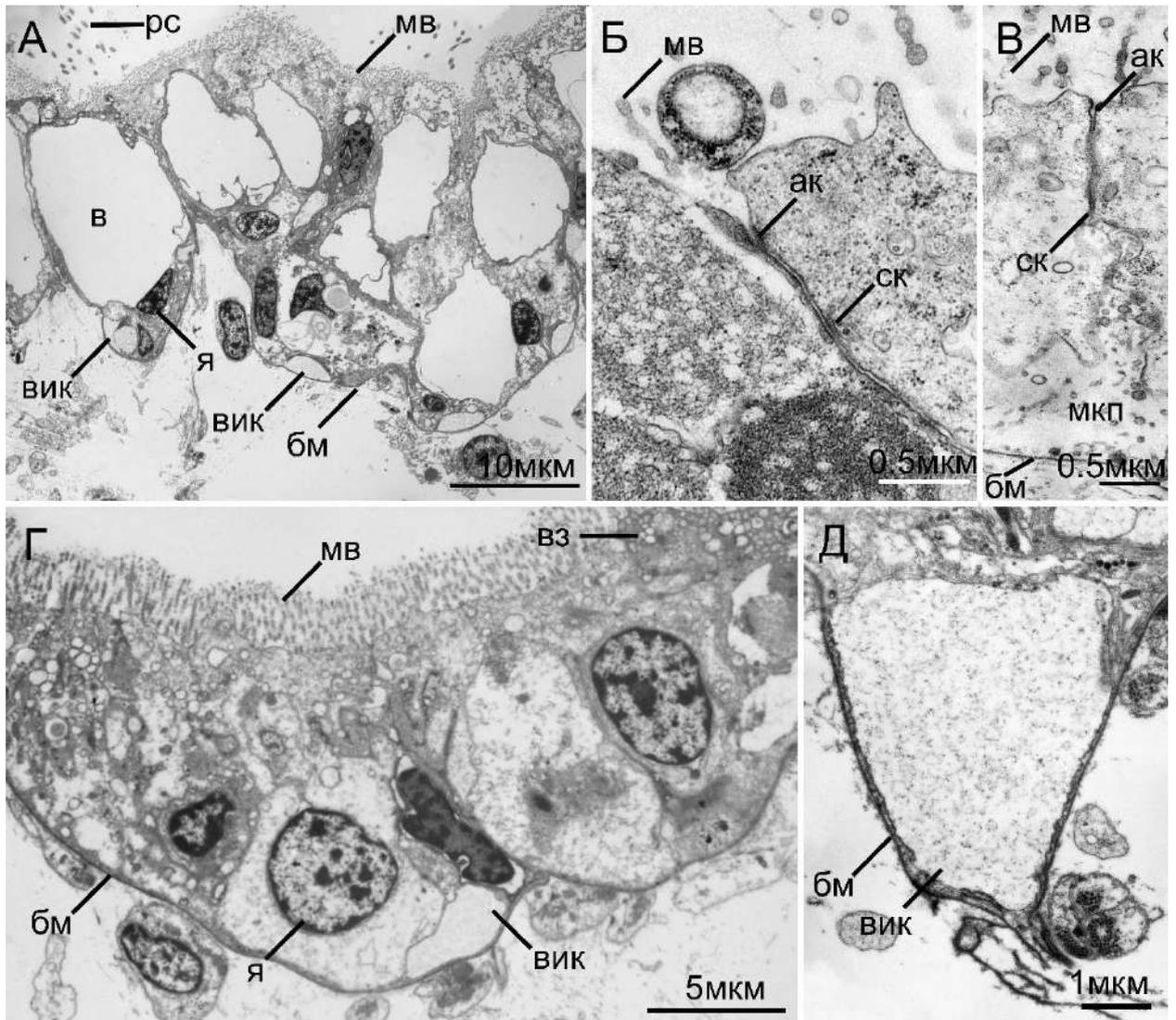


Рисунок 3.21. Особенности ультраструктуры эпителия нотума ювенили *Onchidoris muricata* (размеры особей до 2 мм в длину; ТЭМ). А – фрагмент эпителия с вакуолизированными клетками; Б – адгезивные и септированные клеточные контакты; В – фрагмент эпителия с адгезивным и септированным контактом в апикальной части клеток и межклеточным промежутком в базальной части; Г – фрагмент переходного эпителия, пузырьки в апикальной части клеток; Икс клетки в базальной части эпителия; Д – выпячивание вакуоли Икс клетки в субэпидермальное пространство. Обозначения: ак – адгезивные контакты; бм – базальная мембрана; в – вакуоль; в3 – везикула; вик – вакуоль Икс клетки; км – коллагеновый матрикс; мв – микровилли; мкп – межклеточный промежуток; рес – реснички; ск – септированные контакты; я – ядро.

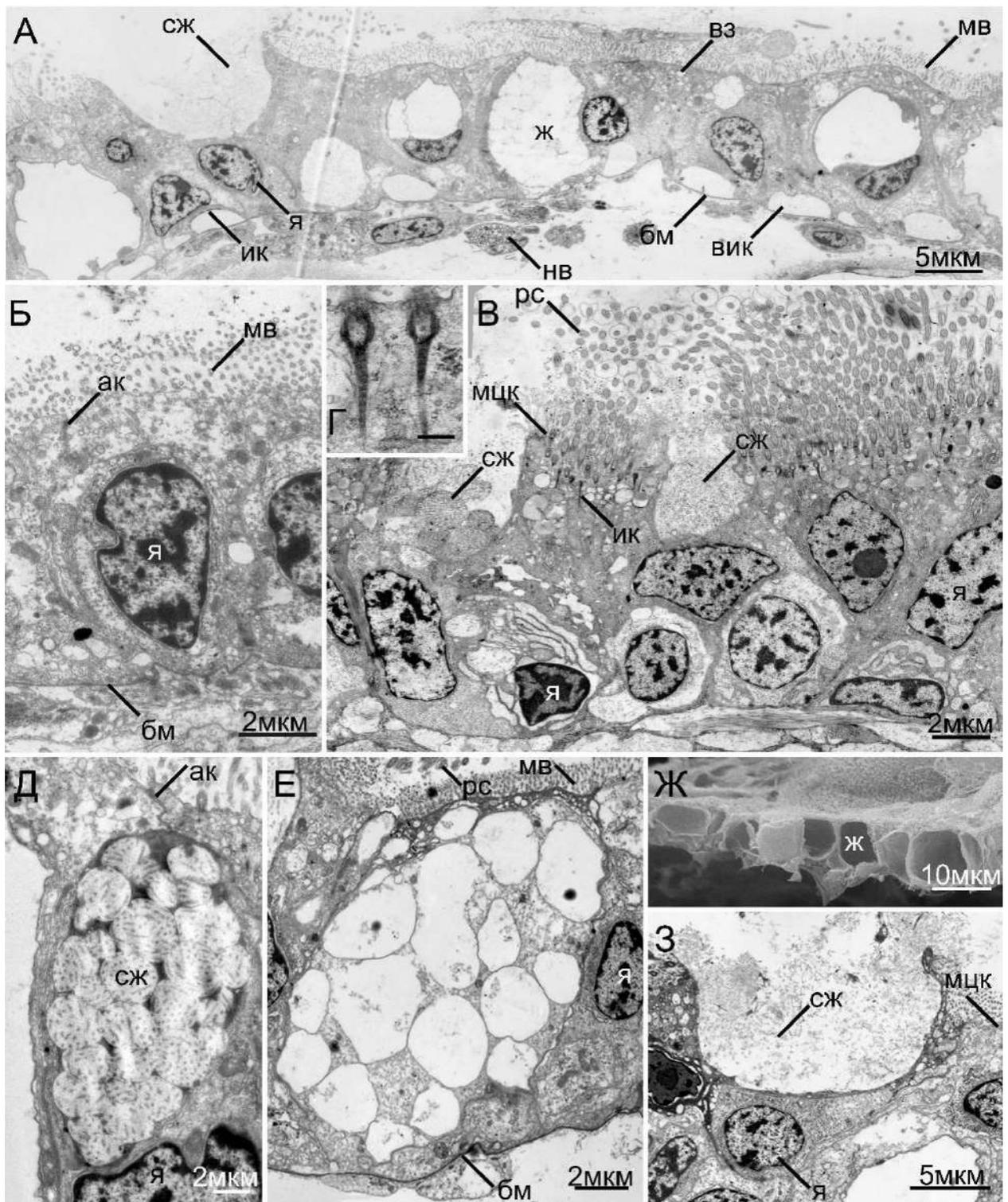


Рисунок 3.22. Особенности ультраструктуры эпителия дорсальной части нотума *Onchidoris turicata* (размеры особей 2-12 мм в длину; ТЭМ, Ж – СЭМ). А – фрагмент железистого эпителия; Б – эпителиальная клетка; В – эпителиальные железы, окруженные мультициллиарными клетками; Г – исчерченные корешки мультициллиарных клеток; Д–З – разнообразие эпителиальных желез. Обозначения: ак – адгезивные контакты; бм – базальная мембрана; в – вакуоль; вз – везикула; вик – вакуоль Икс клетки; ж – эпителиальная железа; км – коллагеновый матрикс; мв – микровилли; мкп – межклеточный промежуток; мцк – мультициллиарная клетка; нв – нерв; рс – реснички; сж – секрет железы; я – ядро.

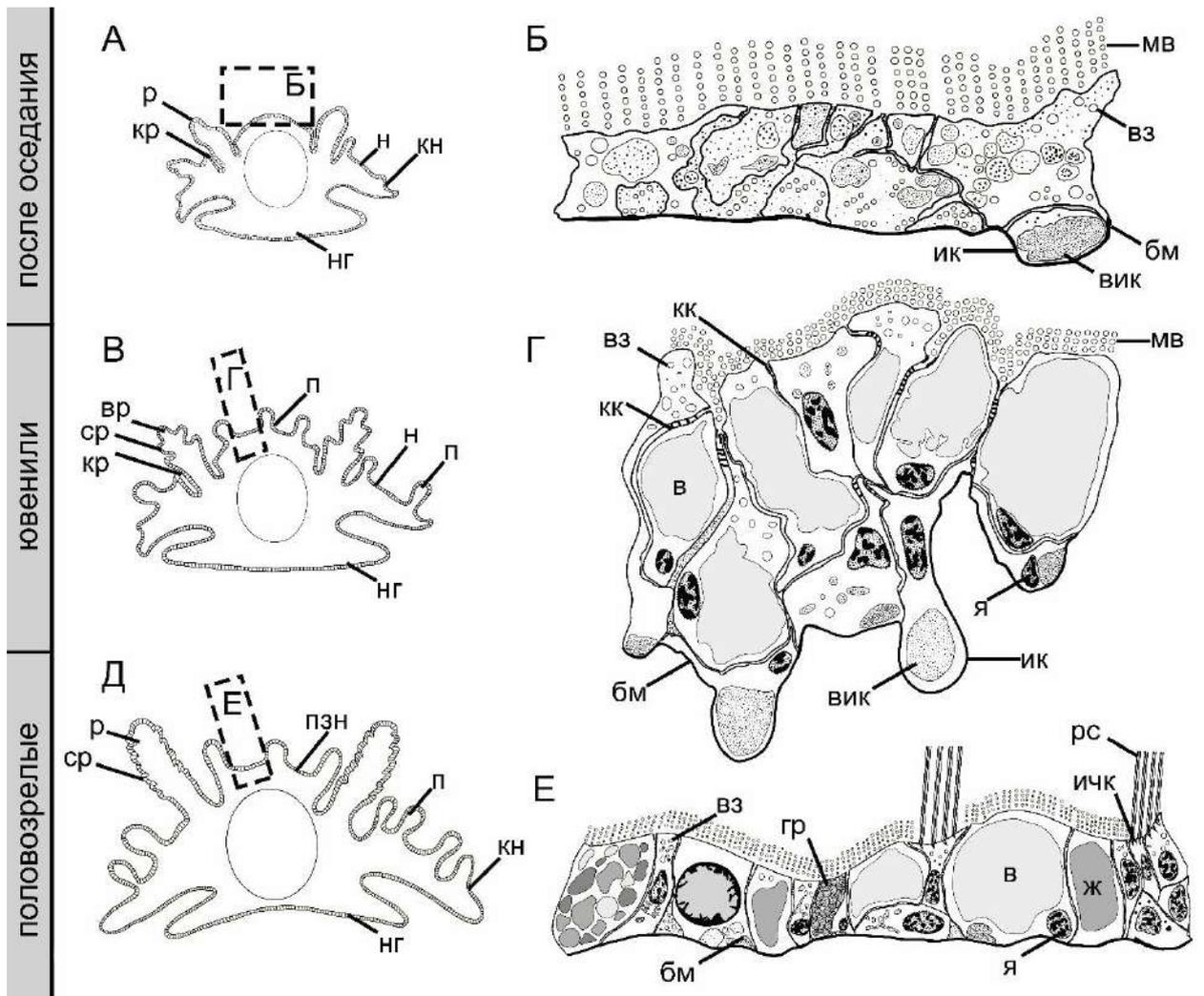


Рисунок 3.23. Схема строения эпителия нотума *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза (по данным ТЭМ). А, Б – сразу после оседания; В, Г – у ювенилей; Д, Е – у половозрелых особей. Б – рыхлый эпителий ранних ювенилей. Г – переходный эпителий ювенилей, икс клетки формируют многочисленные выпячивания в субэпидермальное пространство. Е – столбчатый эпителий половозрелых особей с большим количеством железистых клеток. Обозначения: бм – базальная мембрана; в – вакуоль; в3 – везикулы; вик – вакуоль Икс клетки; вр – верхушка ринофора; гр – гранулы; ж – железистая клетка; ик – Икс клетка; ичк – исчерченные корешки; кн – край нотума; кк – клеточные контакты; кр – карман ринофора; мв – микровилли; н – нотум; нг – нога; п – папилла; ср – складка ринофора; пзн – переходная зона нотума; р – ринофор; рс – реснички; я – ядро.

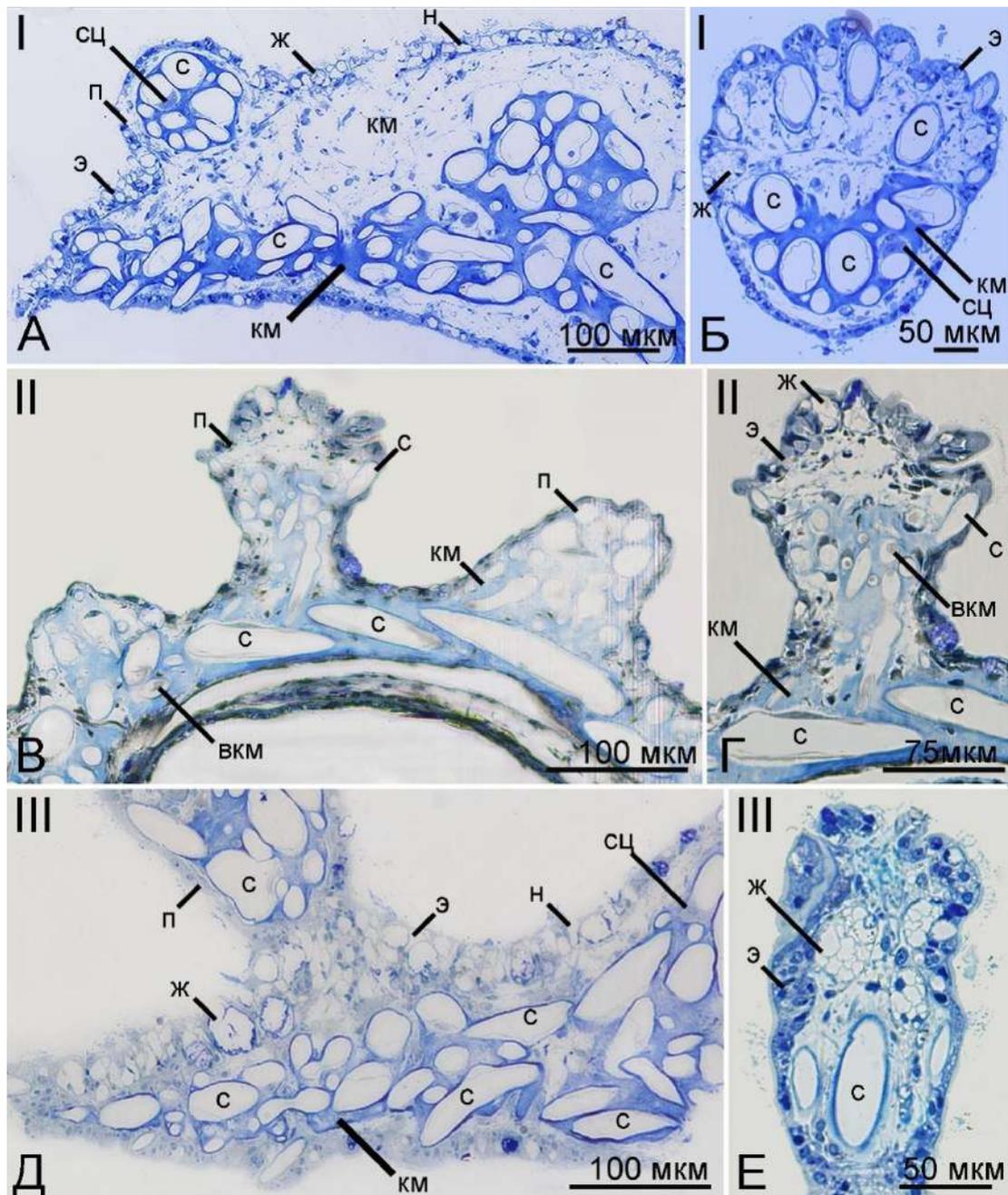


Рисунок 3.24. Особенности морфологии расположения внеклеточного матрикса в нотуме и папиллах трех размерных групп *Onchidoris muricata* (поперечные гистологические срезы, световая микроскопия). А – нотум с папиллами особей от 100 мкм до 2 мм; эпителий содержит железистые клетки; внеклеточный матрикс с фибробластами, спикулы, окруженные общим коллагеновым матриксом; Б – поперечный срез через папиллу с железами и спикулами в толще коллагенового матрикса; В – поперечный срез через центральную часть нотума и папиллы *O. muricata* размером от 2 до 6 мм; спикулы содержат внутриклеточный коллагеновый матрикс; Г – продольный срез через папиллу с железами, спикулы содержат внутриклеточный коллагеновый матрикс, погружены во внеклеточный коллагеновый матрикс; Д – поперечный срез части нотума с папиллами половозрелых особей *O. muricata*; эпителий содержит клеточные железы, спикулы погружены в хорошо развитый общий коллагеновый матрикс; Е – продольный разрез через папиллу половозрелых особей *O. muricata* с железами и спикулами. Обозначения: вкм – внутриклеточный матрикс; ж – железа; км – коллагеновый матрикс; н – нотум; п – папиллы; с – спикулы; сц – склероцит; э – эпителий.

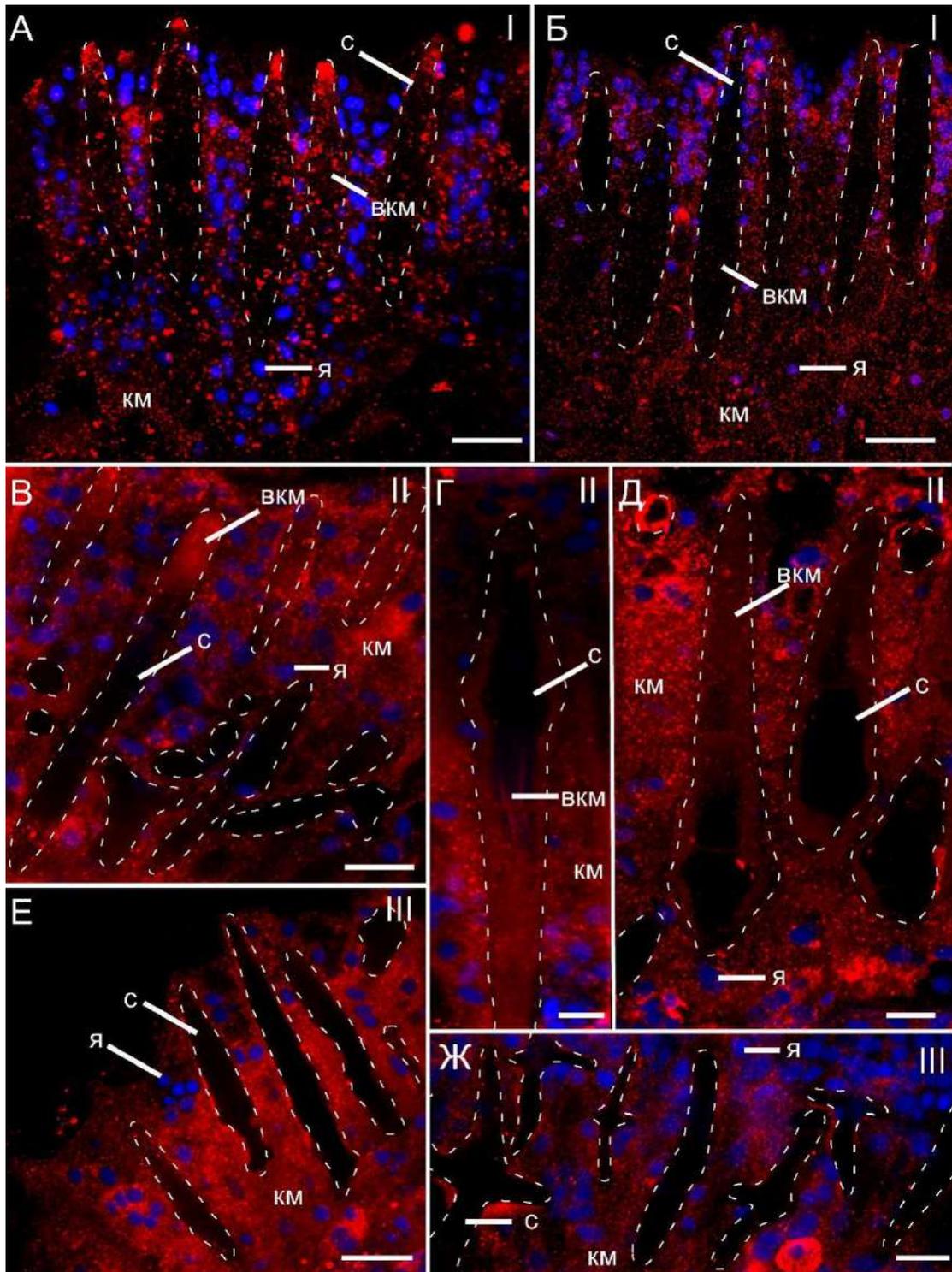


Рисунок 3.25. Коллагеновые волокна в нотуме и спикулах трех размерных групп *Onchidoris muricata*, выявленные иммуногистохимической окраской против коллагена IV типа (конфокальная микроскопия). Красный – коллаген; синий – ядра (DAPI); белые пунктирные линии – контуры спикул. А, Б – ювенилы до 2 мм; В–Д – *O. muricata* размером 2-4мм; Е, Ж – половозрелые особи *O. muricata*. А – коллагеновый матрикс распределен внутри спикул в виде агрегатов; Б – спикулы, внутриклеточный матрикс которых практически не развит; В, Д – коллагеновый матрикс сконцентрирован в концевых зонах спикул и по периферии; Г – коллагеновый матрикс формирует внутренний тяж внутри спикулы; Е, Ж – спикулы половозрелых особей без выраженного коллагенового матрикса. Обозначения: вкм – внутриклеточный матрикс; км – коллагеновый матрикс; с – спикула; я – ядро. Масштаб: А–В – 20 мкм; Г–Д – 10 мкм; Е – 25 мкм; Ж – 10 мкм.

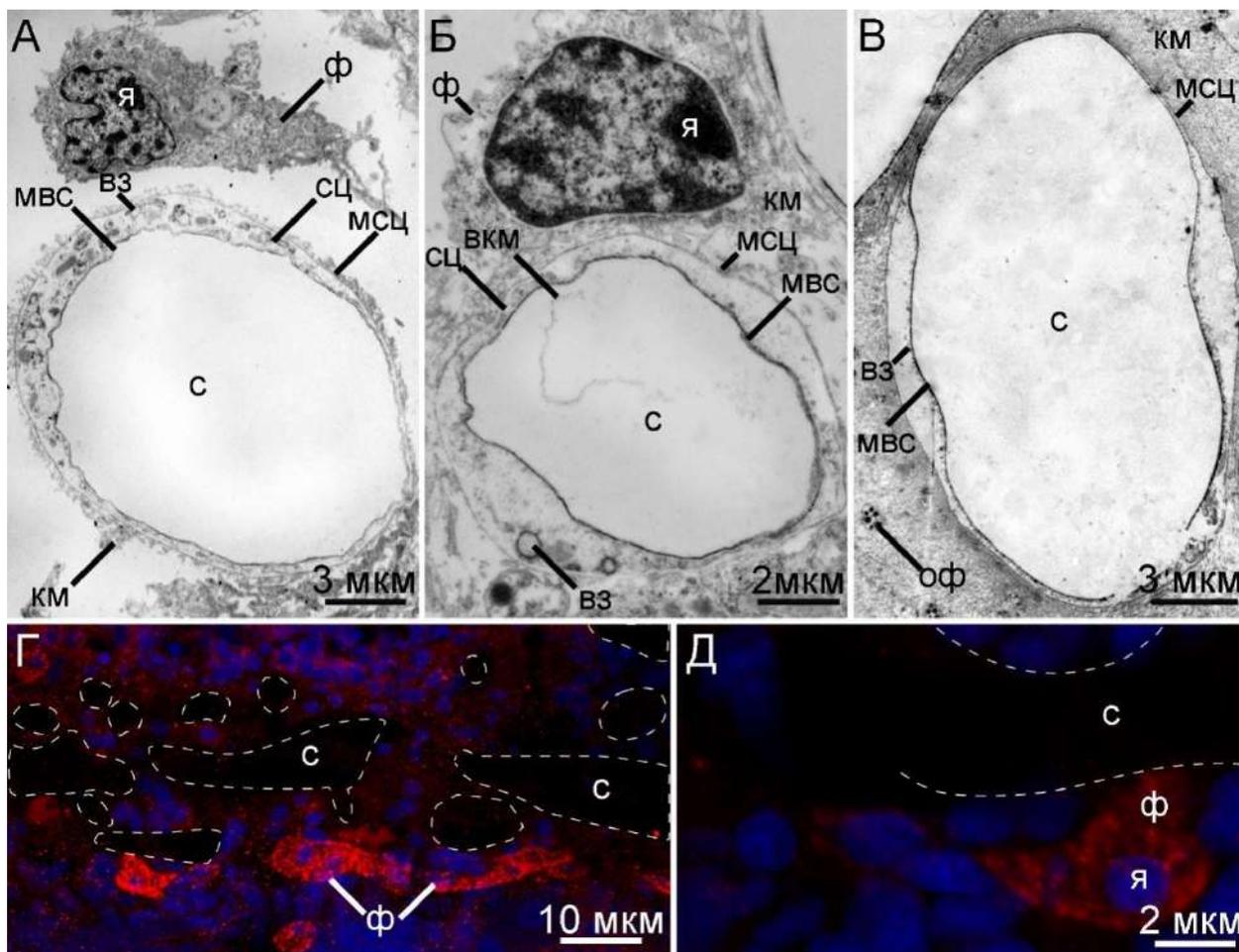


Рисунок 3.26. Особенности ультраструктуры склероцитов и фибробластов *Onchidoris turicata* трех групп (А–В – ТЭМ; Г–Д – КЛСМ). А – склероцит ранних ювенилей с электронно-прозрачным содержимым вакуоли, коллагеновый матрикс развит непосредственно возле спикулы; Б – склероцит ювенилей с внутриклеточным содержимым в виде волокон, коллагеновый матрикс окружает несколько спикул; В – коллагеновый матрикс хорошо развит; Г, Д – ассоциация фибробластов со спикулами фибробластов *O. turicata* первой группы. Красный – коллаген, выявленный иммуногистохимической окраской против коллагена IV типа, синие – ядра, окраска Propidium Iodide, белая пунктирная линия – границы спикул. Обозначения: в3 – везикула; вкм – внутриклеточный матрикс; км – коллагеновый матрикс; мвс – мембрана вакуоли склероцита; мсц – мембрана склероцита; оф – отростки фибробласта; с – спикула; сц – склероцит; ф – фибробласты; эпр – эндоплазматический ретикулум; я – ядро.

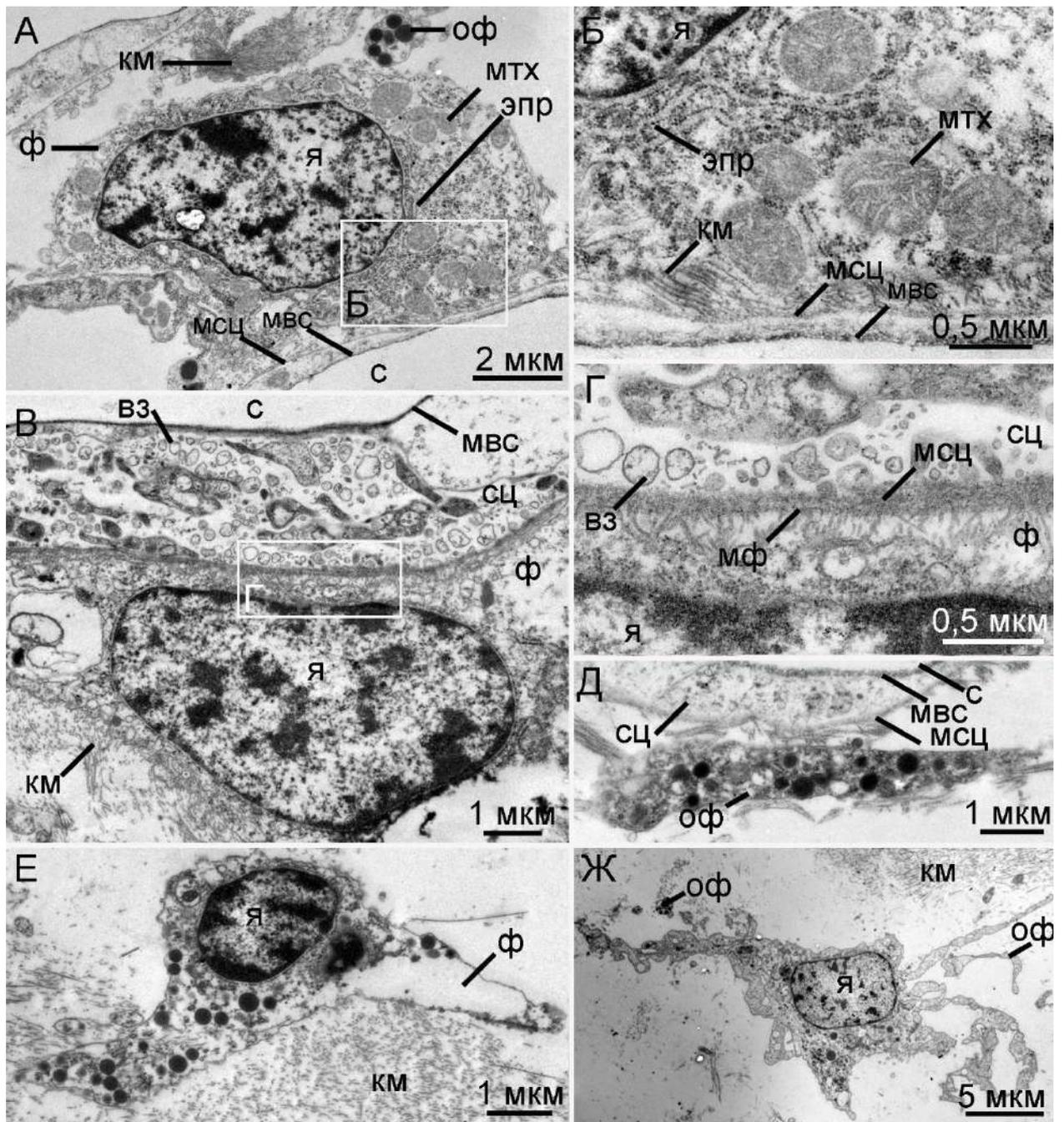


Рисунок 3.27. Особенности ассоциации фибробластов со склероцитами на разных стадиях онтогенеза *Onchidoris muricata* (ТЭМ). А, Б – плотная ассоциация фибробластов со склероцитами ранних ювенилей; В–Д – фибробласты и их отростки вблизи склероцитов ювенилей; Е, Ж – фибробласты в полости тела половозрелых особей *O. muricata*. Обозначения: вз – везикула; гр – гранулы; кв – коллагеновыми волокнами км – коллагеновый матрикс; мвс – мембрана вакуоли склероцита; мсц – мембрана склероцита; мтх – митохондрии; мф – мембрана фибробласта; оф – отросток фибробласта; с – просвет декальцинированной спикулы; сц – склероциты; ф – фибробласты; эпр – эндоплазматический ретикулум; я – ядро.

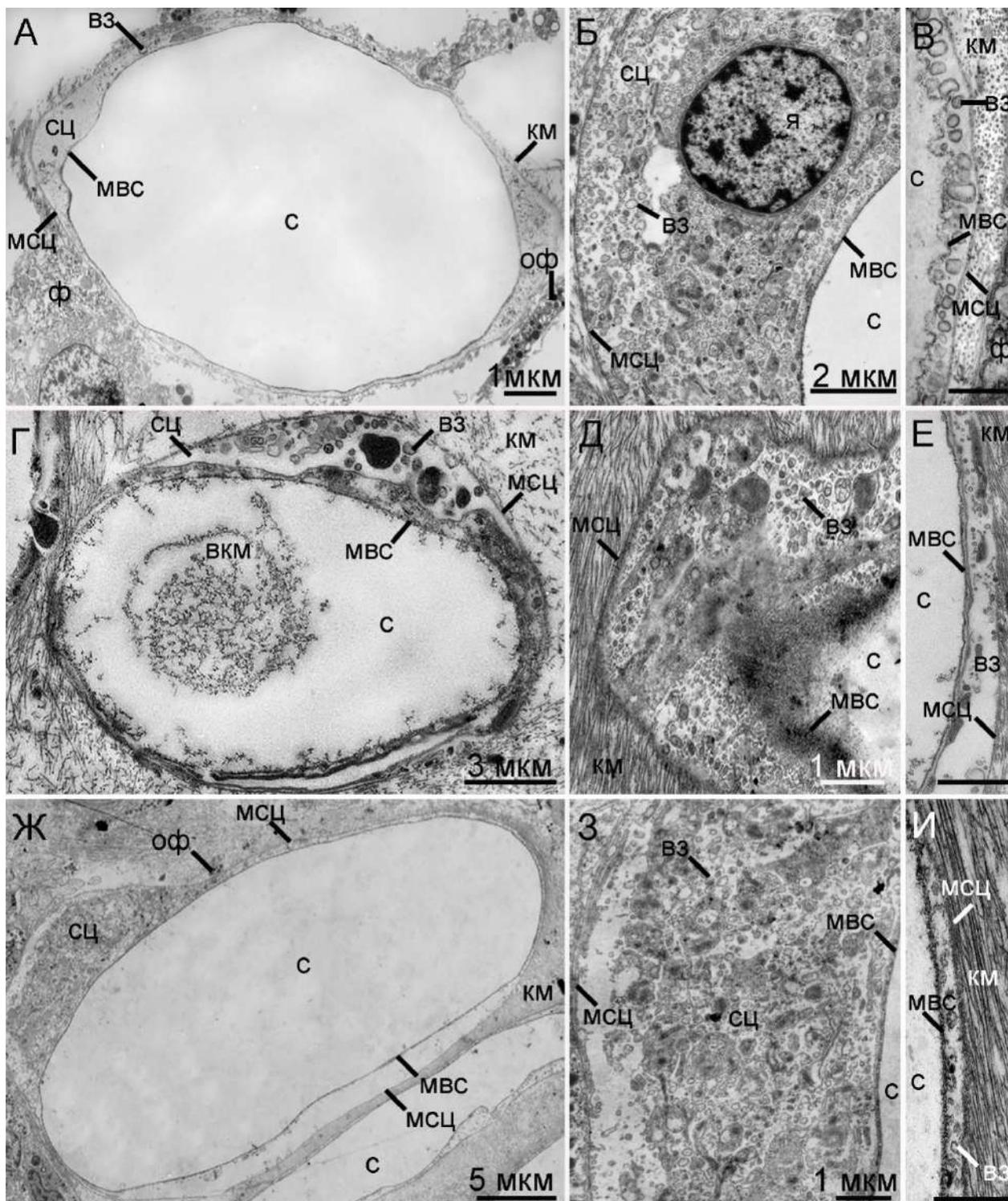


Рисунок 3.28. Особенности ультратонкого строения склерцитов на разных стадиях онтогенеза *Onchidoris muricata* (ТЭМ). А–В – ювенили *O. muricata*; Г–Е – *O. muricata* размером от 2 до 4 мм; Ж–И – половозрелые особи *O. muricata*. А, Г, Ж – поперечный срез через склерцит; Б, Д, З – особенности перинуклеарной области склерцита; В, Е, И – особенности уплощенной зоны цитоплазмы склерцита. Обозначения: в3 – везикулы; вкм – внутриклеточный матрикс; гр – гранулы фибробласта; км – коллагеновый матрикс; мвс – мембрана вакуоли склерцита; мсц – мембрана склерцита; оф – отросток фибробласта; с – спикула; сц – склерцит; ф – фибробласт; я – ядро. Масштаб: В, И – 0,3 мкм; Е – 1 мкм.

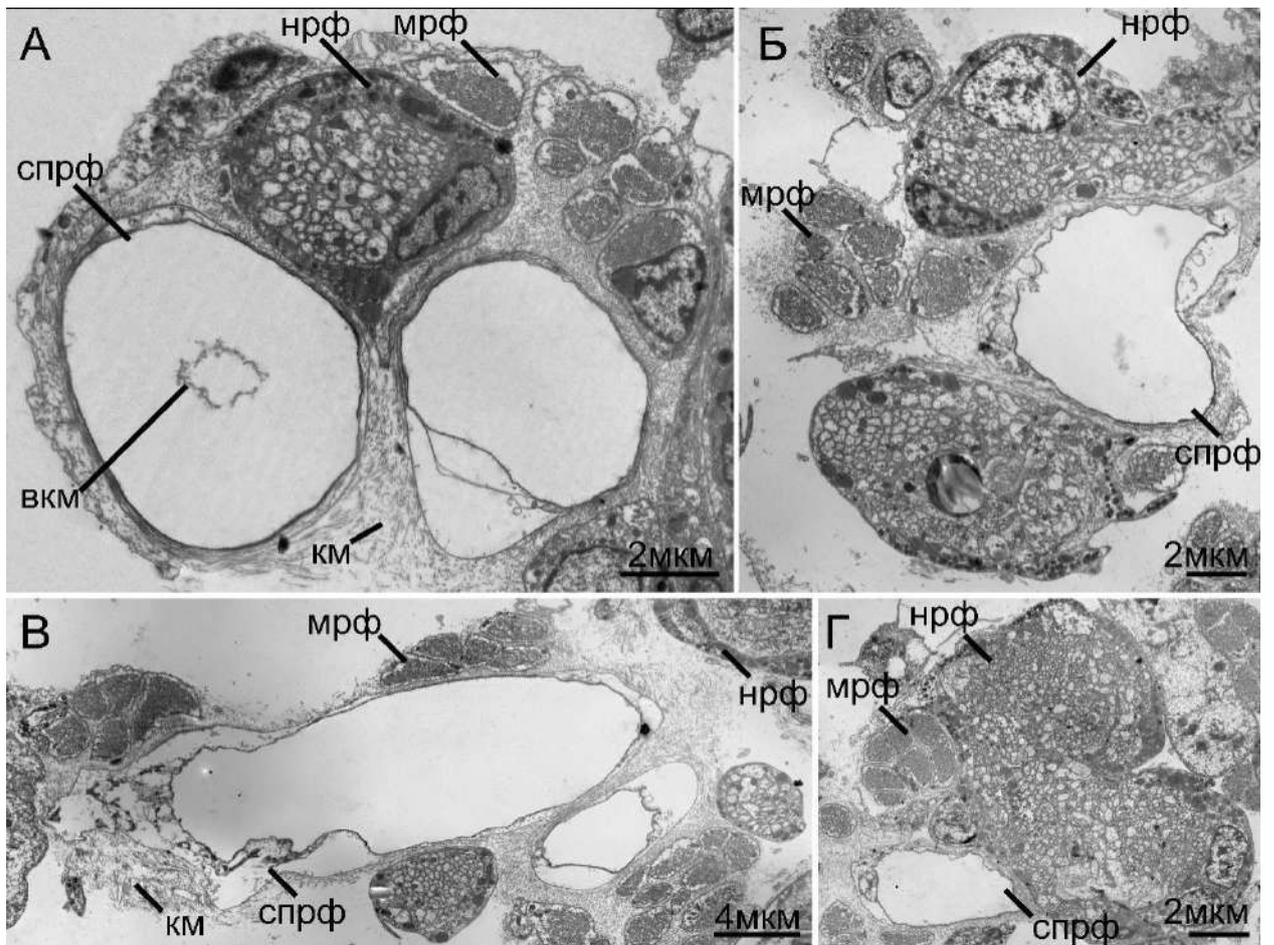


Рисунок 3.29. Ультратонкое строение склероцитов ринофоров *Onchidoris muricata*. Спикулы, мышцы, нервы, погруженные в коллагеновый матрикс в интактном ринофоре формируют триады (ТЭМ). А – склероцит ювенили *O. muricata* центральной части ринофора; Б–Г – склероциты ринофора половозрелой особи. Обозначения: вкм – внутриклеточный матрикс; км – коллагеновый матрикс; нв – нерв ринофора; м – мышцы ринофора; срф – спикулы ринофора.

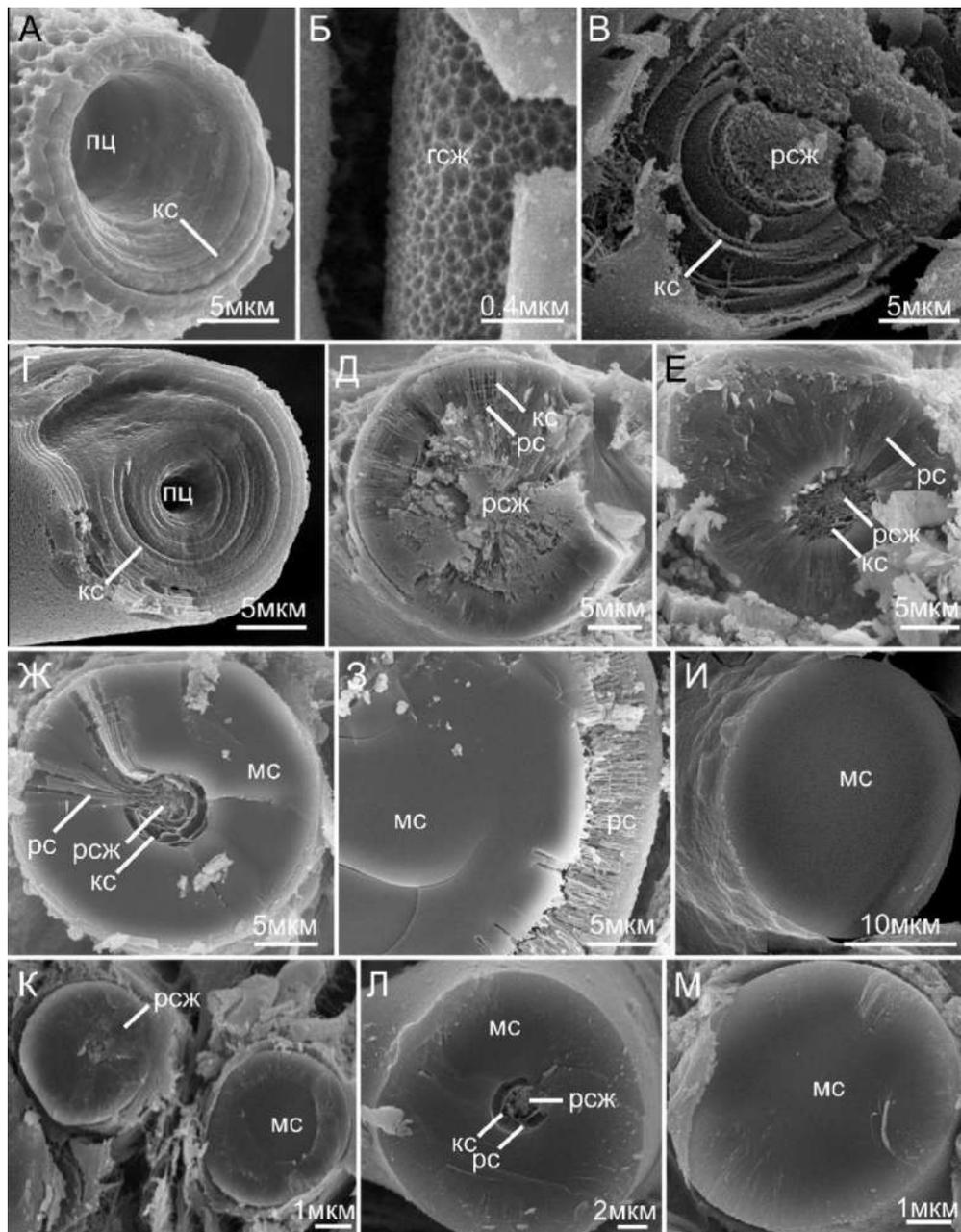


Рисунок 3.30. Особенности внутренней морфологии спикул *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза (СЭМ). А–И – спикулы тела; К–М – спикулы ринофоров. А – спикула ранних ювенилей с полым центром и концентрическими слоями оболочки; Б – рыхлая спикула ранних ювенилей с губчатым содержимым; В – спикула ювенили с рыхлым центром и концентрическими слоями по периферии; Г – спикула ювенили с полым центром и концентрическими слоями по периферии; Д – спикула неполовозрелой особи со смешанной внутренней структурой, имеет рыхлый центр, радиальные и концентрические слои; Е – спикула неполовозрелой особи с рыхлым центром и радиальными слоями по периферии; Ж – спикула неполовозрелой особи с монолитной, концентрической и радиальной внутренней структурой; З – спикула половозрелой особи с монолитным центром и радиальной слоистостью по периферии; И – полностью монолитная спикула половозрелой особи; К – спикула ринофора ювенили с рыхлым содержимым; Л – спикула ринофора неполовозрелой особи со смешанной внутренней структурой; М – монолитная спикула ринофора половозрелой особи. Обозначения: гсж – губчатое содержимое; пц – полый центр; кс – концентрические слои; мс – монолитное содержимое; рс – радиальные слои; рсж – рыхлое содержимое.

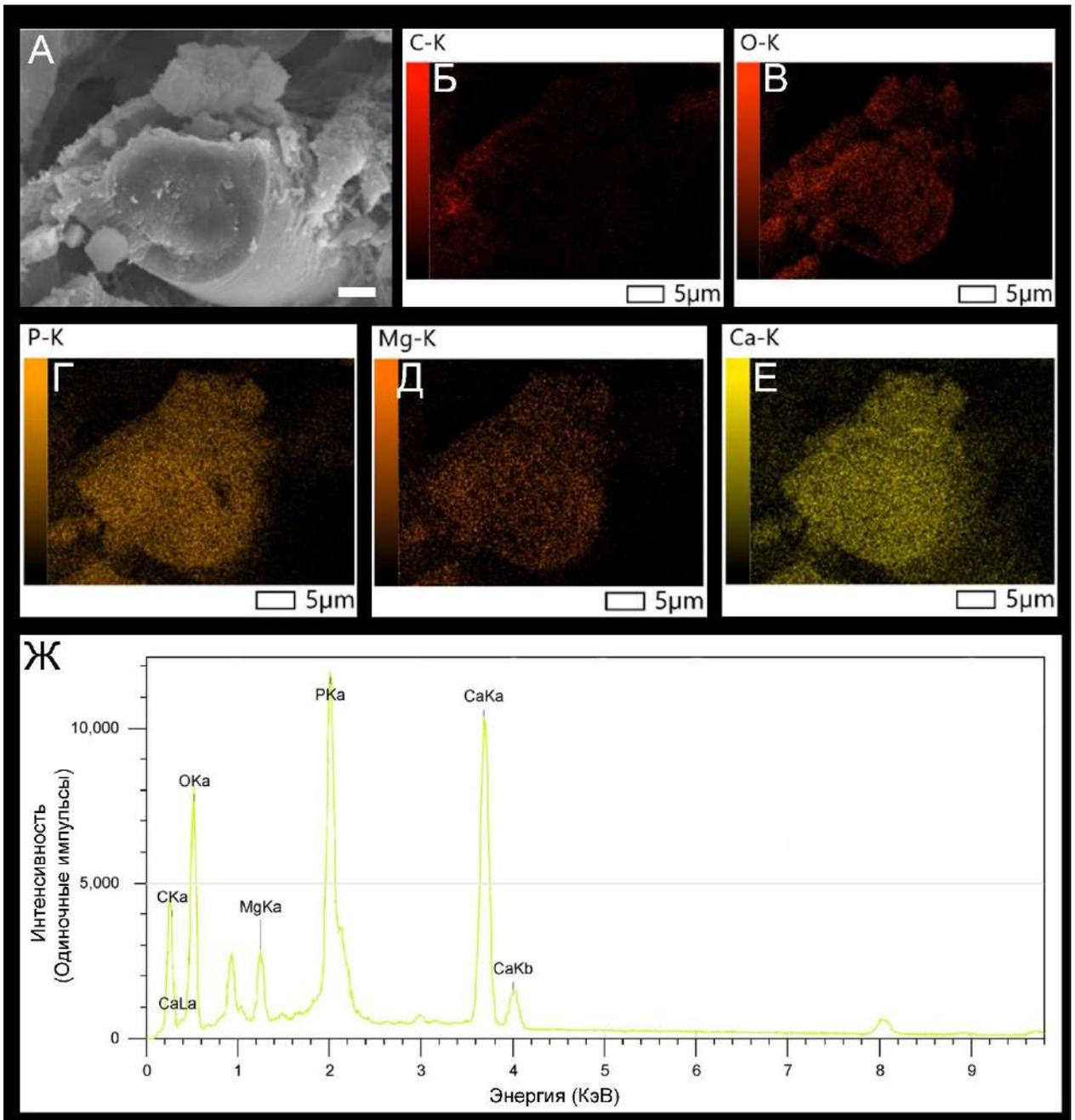


Рисунок 3.31. Элементный состав рыхлой спикулы *Onchidoris muricata* (СЭМ, ЭДС). А – слом рыхлой спикулы ювенили; Б – Г – картирование элементов в составе рыхлой спикулы; Б – углерода (С); В – кислорода (О); Г – фосфора (Р), Д – магния (Mg); Е – кальция (Ca). Ж – график соотношения элементов в составе в спикуле. Обозначения К, Ка, Кб, Ла соответствуют энергетическому уровню электронов в атоме элемента. Масштаб: А– 5 мкм.

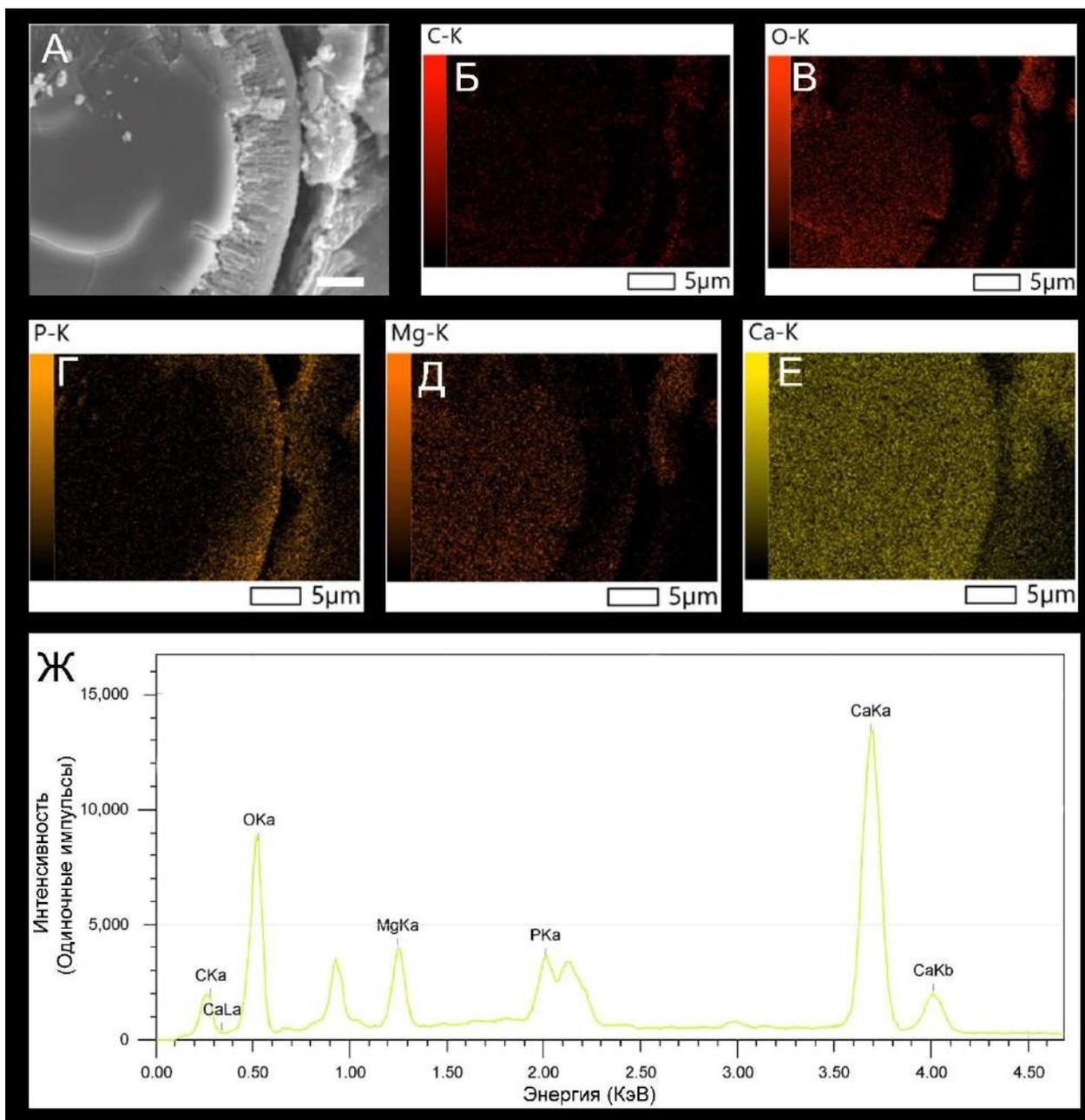


Рисунок 3.32. Элементный состав смешанной спикулы с монолитным центром и радиальной слоистостью по периферии неполовозрелой особи *Onchidoris muricata* (СЭМ, ЭДС). А – слом спикулы ювенили; Б – Г – картирование элементов в составе спикулы; Б – углерода (С); В – кислорода (О); Г – фосфора (Р), Д – магния (Mg); Е – кальция (Ca). Ж – график соотношения элементов в составе в спикуле. Обозначения К, Ка, Кб, Ла соответствуют энергетическому уровню электронов в атоме элемента. Масштаб: А– 5 мкм.

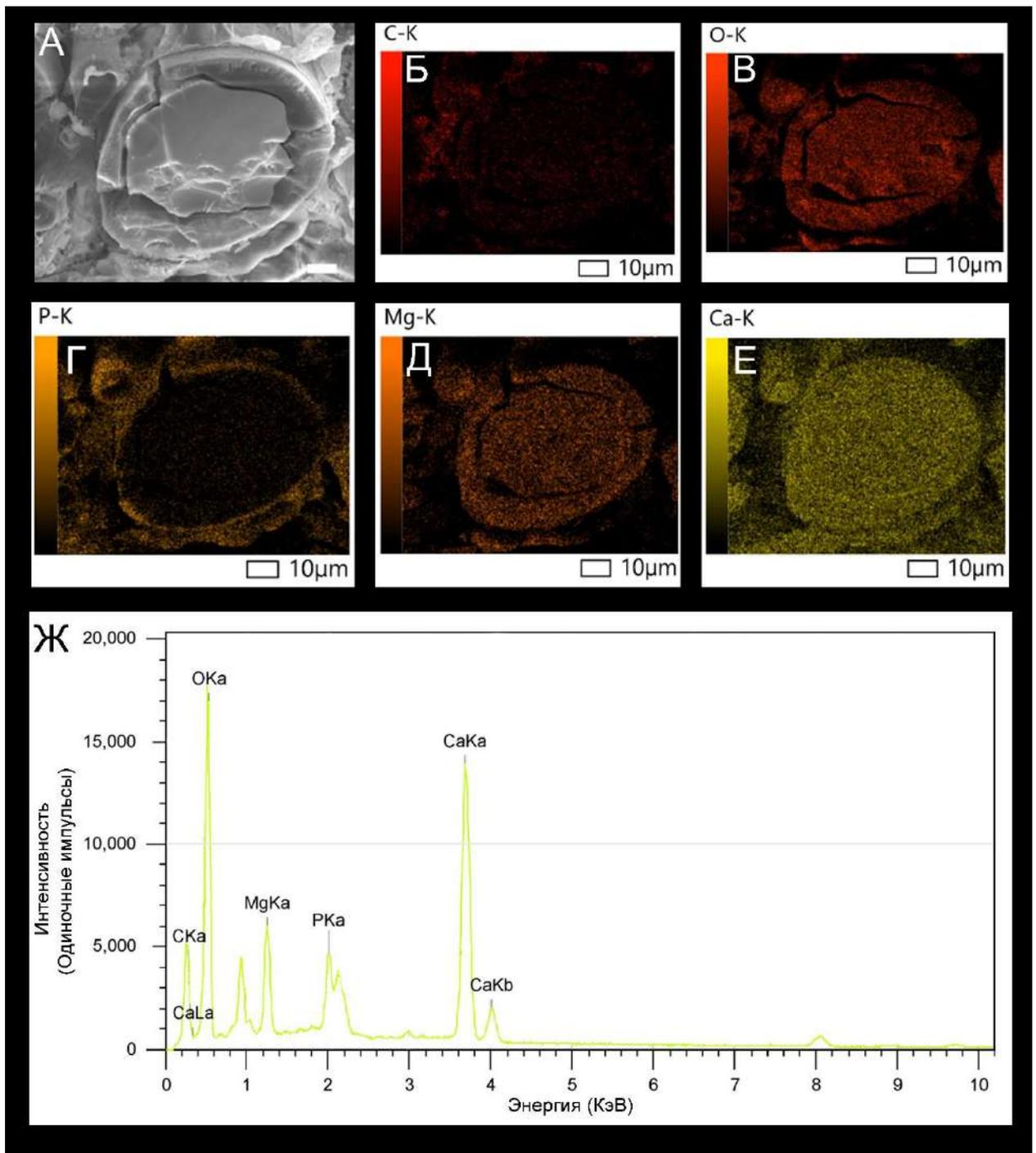


Рисунок 3.33. Элементный состав монолитной спикулы половозрелой особи *Onchidoris muricata* (СЭМ, ЭДС). А – слом спикулы ювенили; Б – Г – картирование элементов в составе спикулы; Б – углерода (С); В – кислорода (О); Г – фосфора (Р), Д – магния (Mg); Е – кальция (Ca). Ж – график соотношения элементов в составе в спикуле. Обозначения К, Ка, Кб, Ла соответствуют энергетическому уровню электронов в атоме элемента. Масштаб: А – 10 мкм.

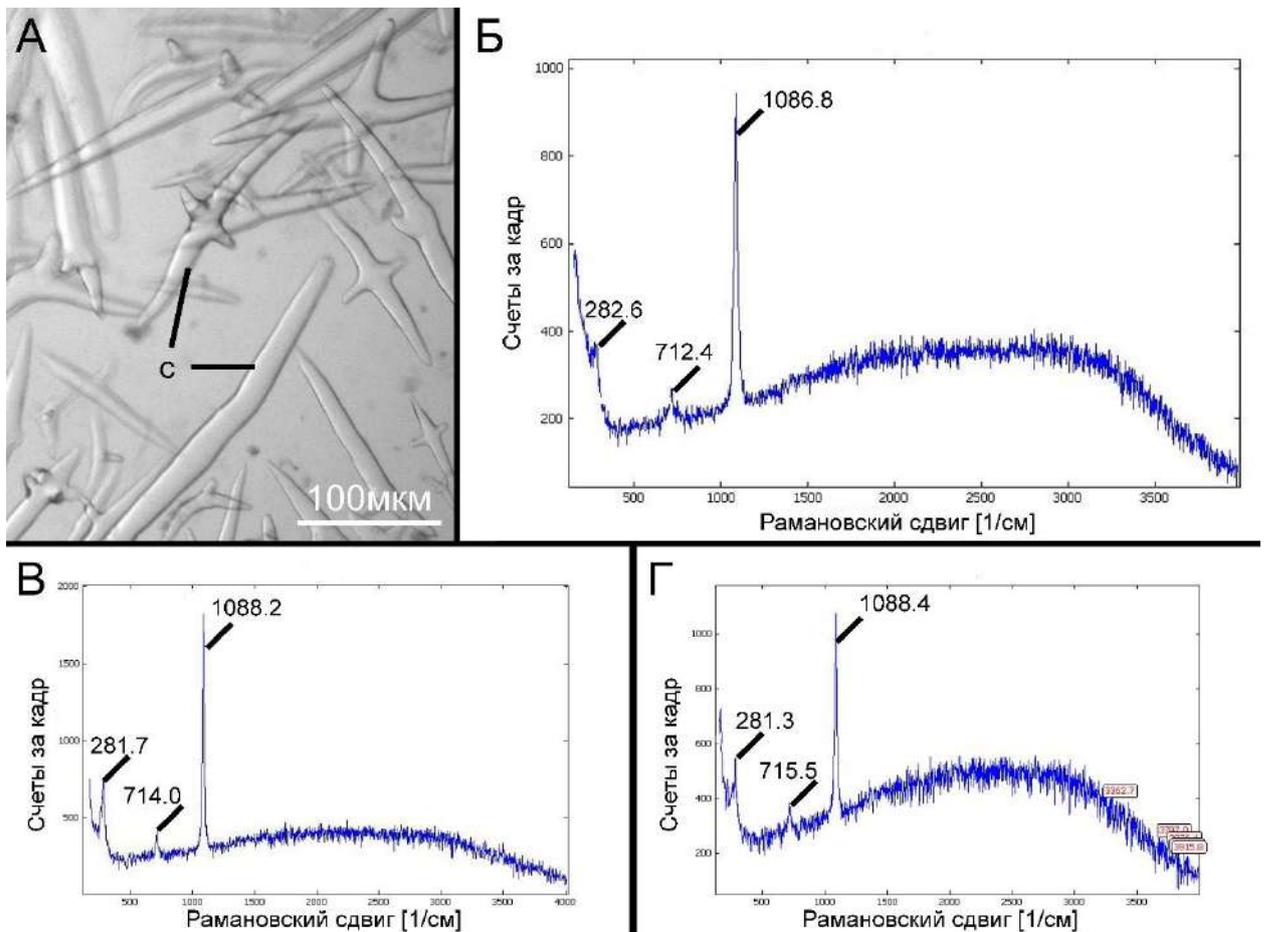


Рисунок 3.34. Химический состав спикул половозрелых особей *Onchidoris muricata* (А – световая микроскопия, Б–Г – данные Рамановской спектроскопии). А – внешняя морфология спикул; Б – Рамановский сдвиг кальцита спикул, характеризуется острым пиком при волновых модах равных 1086 см^{-1} (симметричная мода растяжения карбоната-иона), 282 см^{-1} (либрационная мода) и 712 см^{-1} (изгиб в плоскости группы $(\text{CO}_3)_2$), что соответствует эталонному значению кальцита; В, Г – Рамановский сдвиг магниезиального кальцита спикул, характеризуется наличием пиков в положении либрационной моды ($281,3\text{-}281,7\text{ см}^{-1}$); изгиба в плоскости ($714,0\text{-}715,5\text{ см}^{-1}$); и симметричном растяжении ($1088,2\text{-}1088,4\text{ см}^{-1}$). Обозначения: с – спикулы.

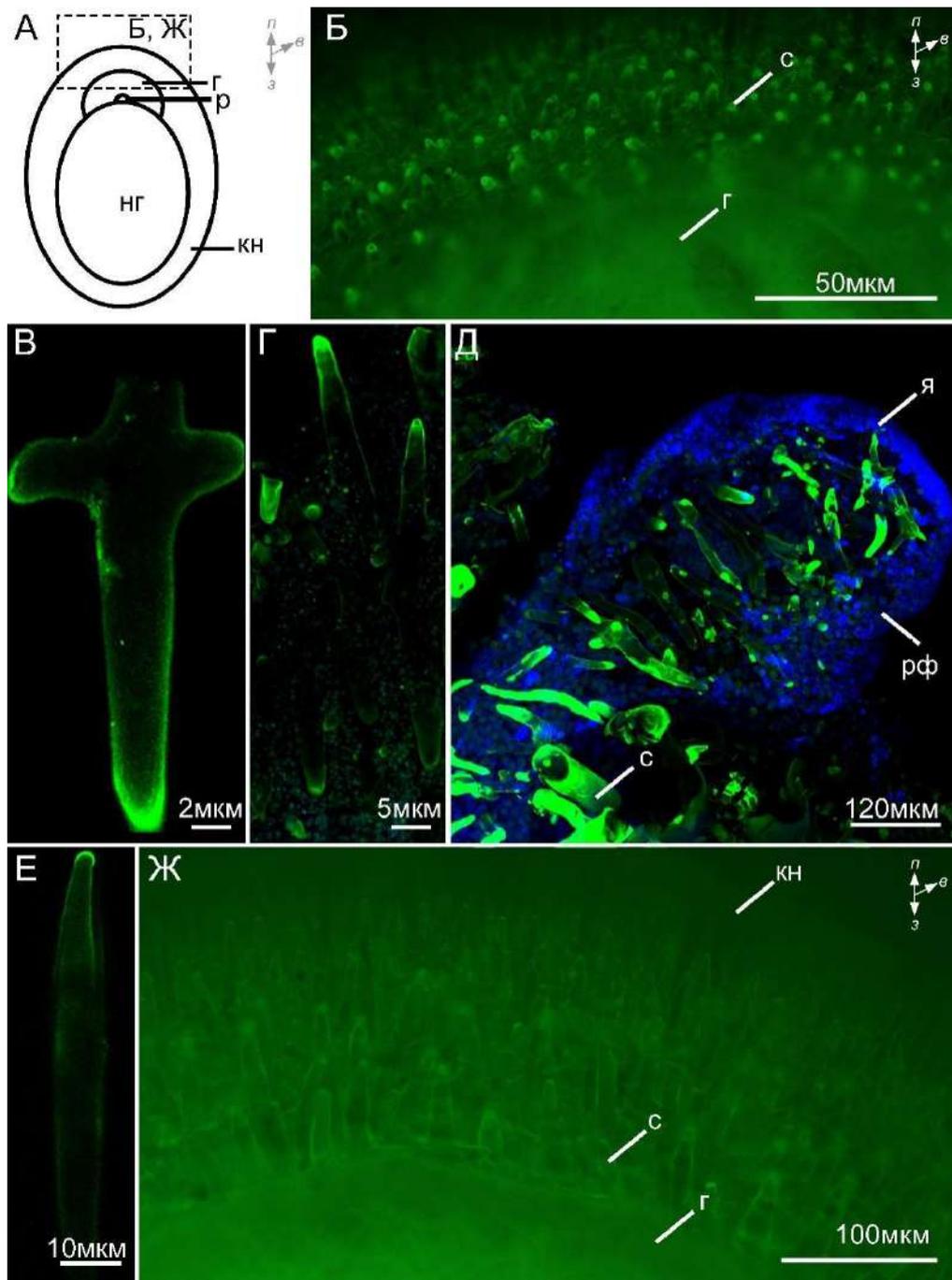


Рисунок 3.35. Зоны отложения кальция в спикулах *Onchidoris muricata* после 21-дневной экспозиции в динатриевой соли кальция (флуоресцентная микроскопия, КЛСМ). А – схема строения вентральной стороны стела; Б – зоны отложения кальция (зеленый) в спикулах вентральной стороны нотума ювенилей *O. muricata*; В – отпрепарированная спикула ювенили с зонами кальцификации в концевых участках и по периферии; Г – спикулы нотума ювенили *O. muricata* с зоной кальцификации в концевых участках; Д – зоны кальцификации спикул в ринофоре ювенили *O. muricata* (синие – ядра, окраска DAPI); Е – отпрепарированная спикула нотума половозрелой особи *O. muricata* без выраженной зоны кальцификации по периферии, незначительная зона отложения кальция выражена только на кончике спикулы; Ж – спикулы вентральной части нотума половозрелой особи *O. muricata* без выраженных зон кальцификации. Обозначения: г – голова; кн – край нотума; нг – нога; р – рот; рф – ринофор; с – спикула; я – ядро. Обозначение осей: в – вентральная; д – дорсальная; з – задняя; п – передняя.

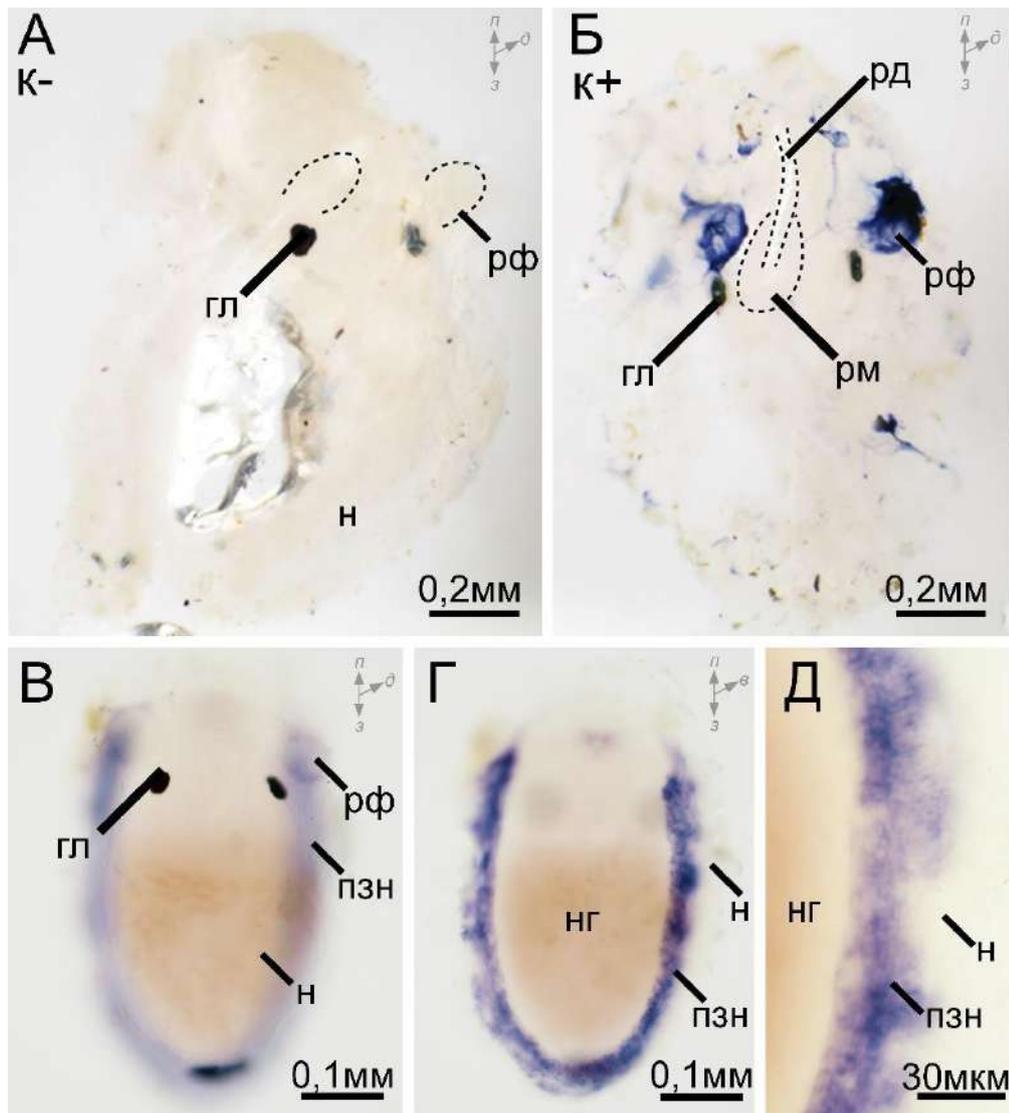


Рисунок 3.36. Визуализация паттернов экспрессии карбоангидразы (CA01-3) у ранней ювенили *Onchidoris muricata* методом *in situ* гибридизации. А – целый моллюск, отрицательный контроль; Б – целый моллюск, положительный контроль; В – ранняя ювениль *O. muricata* после метаморфоза с гладкими ринофорами и еще не развитыми папиллами; В–Д – паттерн экспрессии в переходной зоне нотума и ноги (В – вид с дорсальной стороны; Г, Д – вид с вентральной стороны). Обозначения: гл – глаз; нг – нога; н – нотум; пз – переходная зона ноги и нотума; рд – радула; рм – радулярный мешок; рф – ринофор. Обозначение осей: в – вентральная; д – дорсальная; з – задняя; п – передняя.

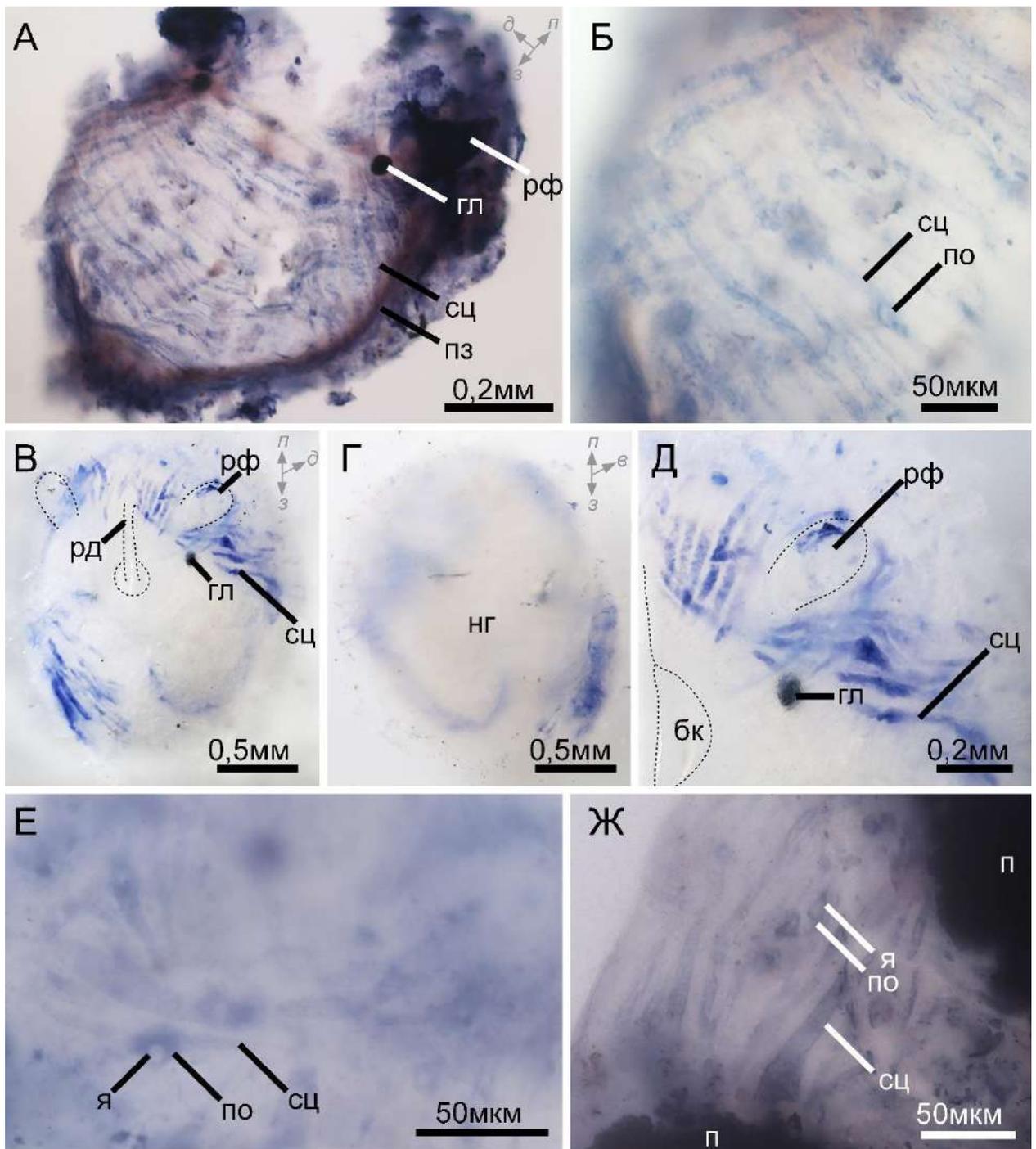


Рисунок 3.37. Визуализация паттернов экспрессии карбоангидразы (CA01-3) у *Onchidoris turicata* методом *in situ* гибридизации. А – ювенильная особь размером 600 мкм, паттерн наблюдается как в склероцитах, так и в мантийной борозде; Б, Е, Ж – сигнал в внутриклеточно в склероцитах ювенилей; В – паттерн экспрессии карбоангидразы у ювенили размером 2 мм в склероцитах; Г – ювениль размером 2 мм, вид с вентральной стороны, сигнала в склероцитах ноги не обнаружен; Д – паттерн экспрессии в склероцитах, окружающих ринофор. Обозначения: гл – глаз; мс – мантийная складка; нг – нога; по – перинуклеарное пространство; рд – радула; рф – ринофор; сц – склероцит; я – ядро. Обозначение осей: в – вентральная; д – дорсальная; з – задняя; п – передняя.

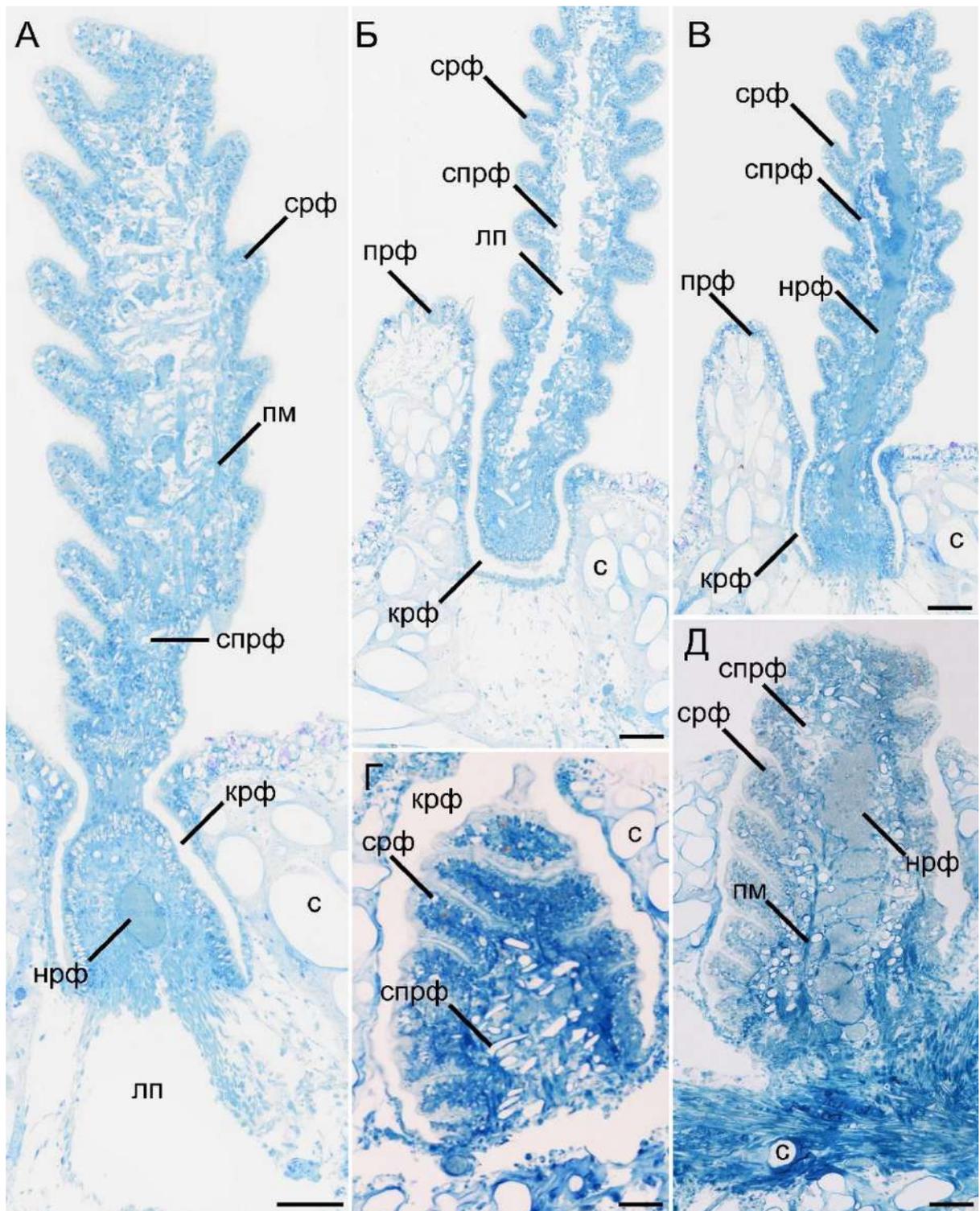


Рисунок 3.38. Особенности гистологического строения ринофора взрослой особи *Onchidoris muricata* (световая микроскопия, сагитальные срезы). А–В – расслабленный ринофор; Г–Д – сокращенный ринофор. А – срез через стенку ринофора со спикулами, карманом ринофора и папиллами, окружающими ринофор; Б – срез через лимфатический канал ринофора; В – срез через нерв ринофор; Г – срез через стенку втянутого в карман ринофора; Д – срез через нерв втянутого ринофора. Обозначения: крф – карман ринофора; лп – лимфатическая полость; нрф – нерв ринофора; пм – продольные мышцы; прф – папиллы ринофора; с – спикула; спрф – спикулы ринофора; срф – складка ринофора. Масштаб: А–Г – 60 мкм; Д – 65 мкм.

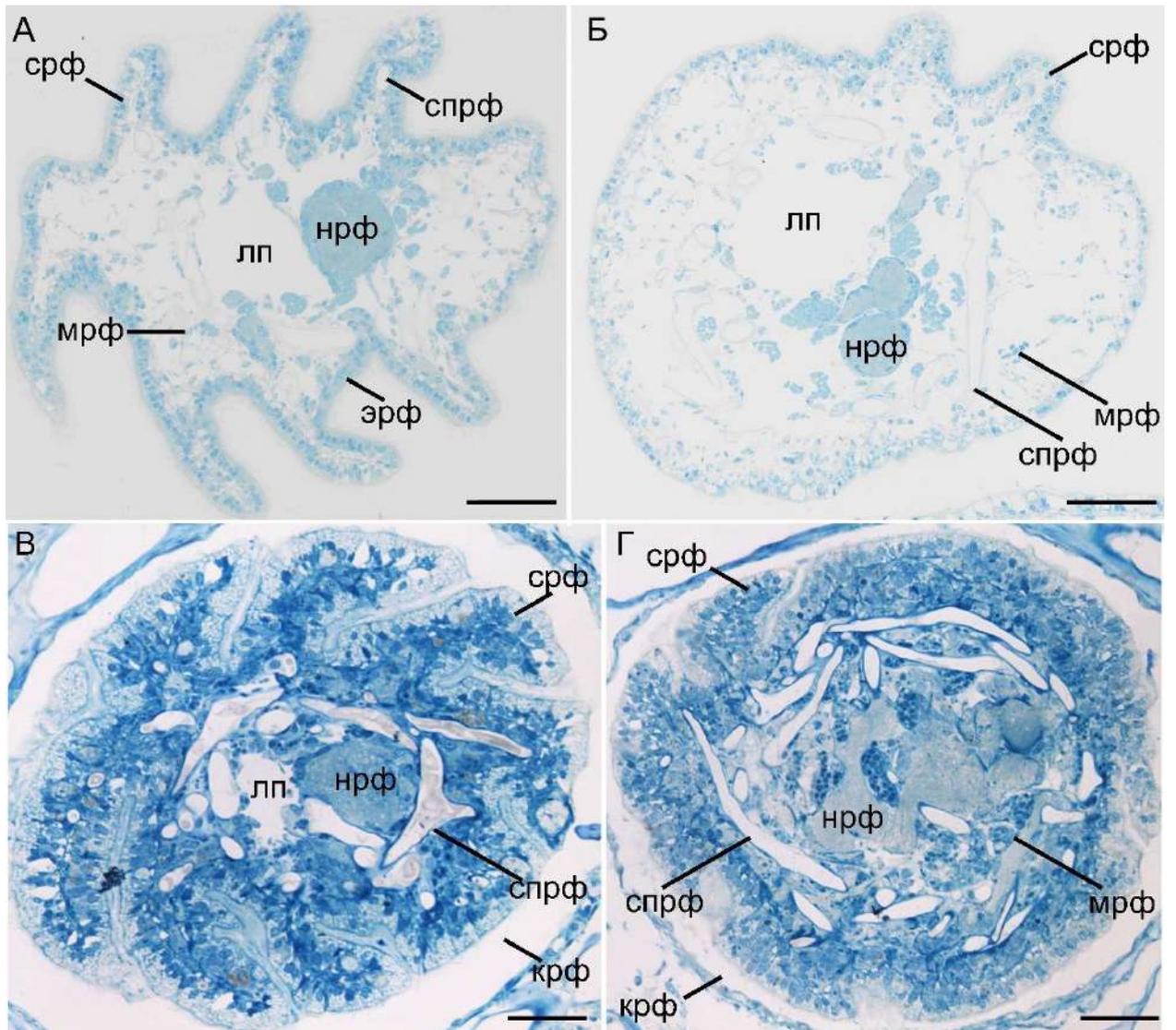


Рисунок 3.39. Особенности гистологического строения ринофора взрослой особи *Onchidoris muricata* (световая микроскопия, поперечные срезы). А–Б – расслабленный ринофор; В–Г – сокращенный ринофор. А, В – срез складок ринофора; Б, Г – срез основания (рахиса) ринофора. Обозначения: крф – карман ринофора; лп – лимфатическая полость; нрф – нерв ринофора; пм – продольные мышцы; прф – папиллы ринофора; с – спикула; спрф – спикулы ринофора; срф – складка ринофора; эрф – эпителий ринофора. Масштаб: 50 мкм.

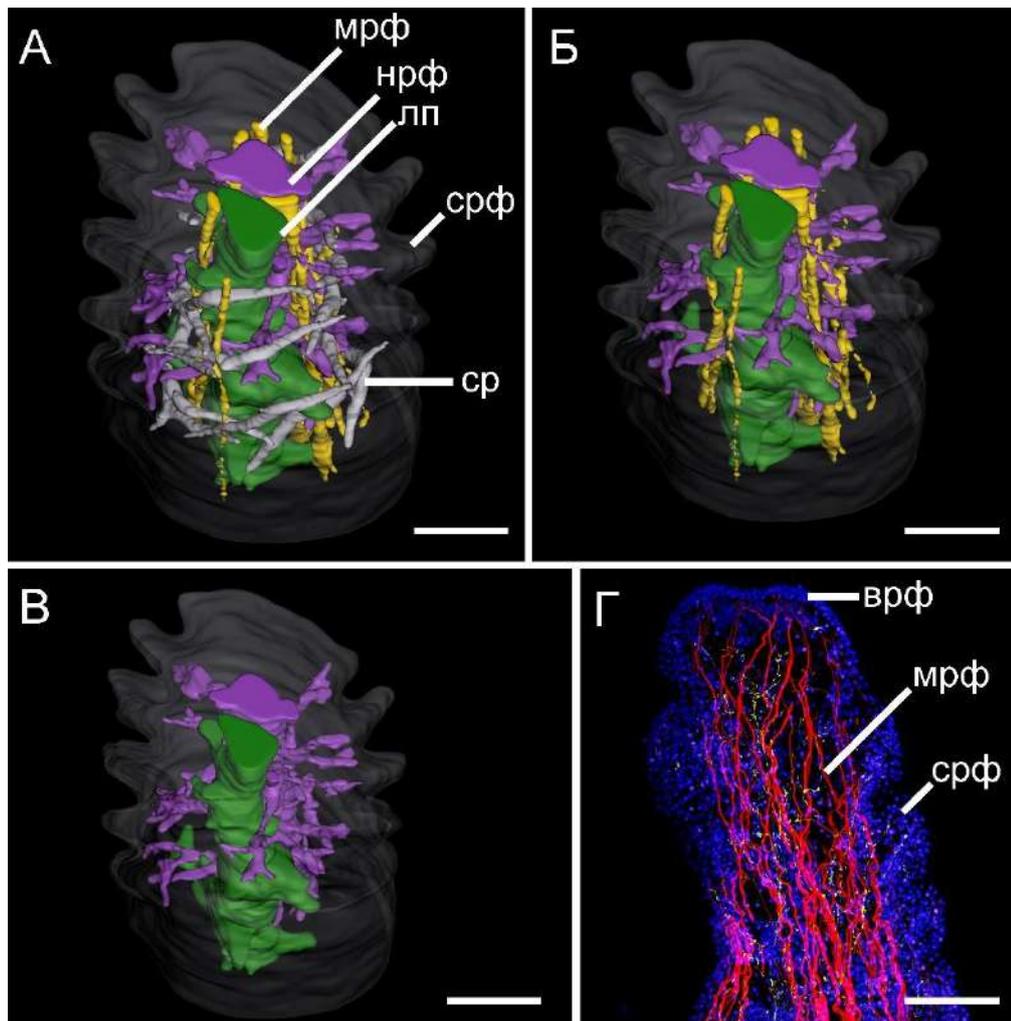


Рисунок 3.40. Внутренняя морфология ринофора взрослой особи *Onchidoris muricata*. (А–В – трехмерная реконструкция; Г – КЛСМ). А – внутренняя морфология ринофора со спикулами; Б – взаимное расположение нервов, мышц и лимфатической полости в ринофоре; В – взаимное расположение лимфатической полости и нерва ринофора; Г – иммуногистохимическое окрашивание ринофора против серотонина, желтый – нервы (окрашены против серотонина); синий – ядра (DAPI); красный – мышцы ретракторы (Phalloidin). Обозначения: врф – верхушка ринофора; лп – лимфатическая полость ринофора; мрф – мышцы ринофора; нрф – нервы ринофора; ср – складка ринофора; срф – складка ринофора. Масштаб: А – В – 100 мкм; Г – 50 мкм.

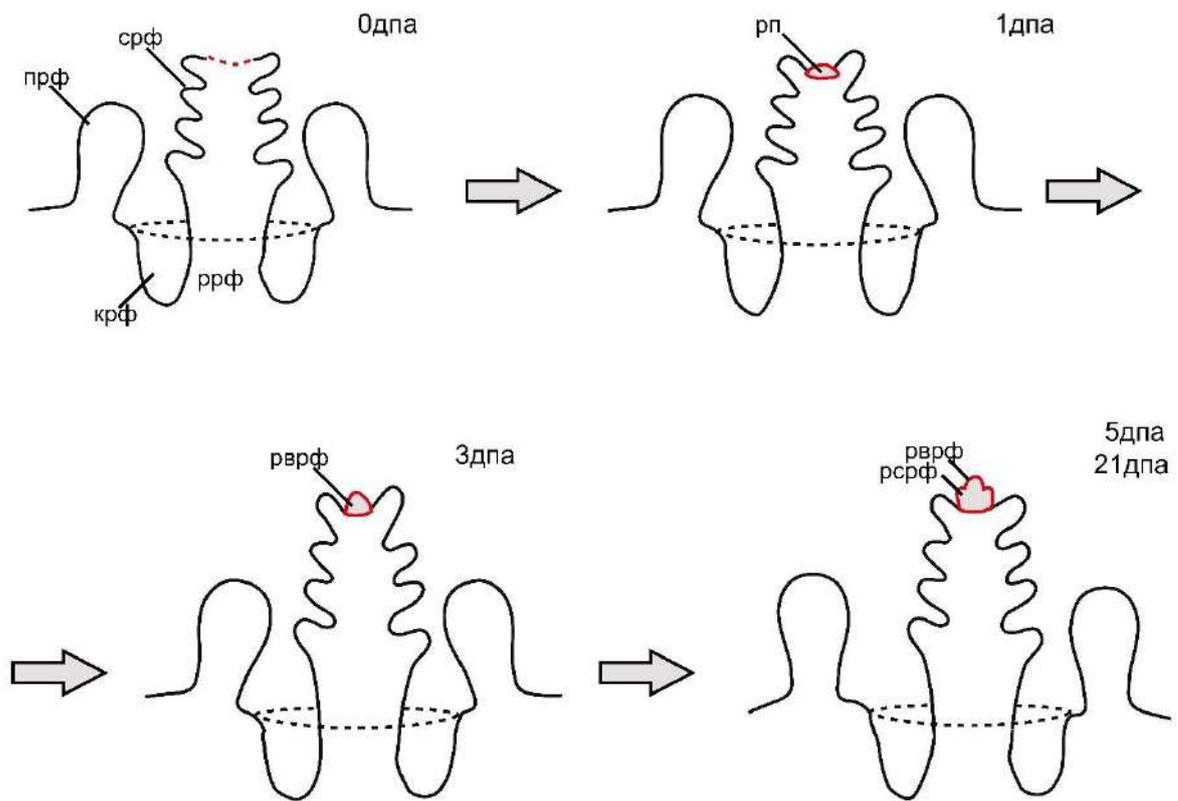


Рисунок 3.41. Схема восстановления ринофора *Onchidoris muricata* после отрезания верхушки и трех складок в течение 21 дня после ампутации (дпа). Обозначения: крф – карман ринофора; прф – папиллы ринофора; рврф – регенерирующая верхушка ринофора; рп – регенерационная почка; ррф – регенерирующая ринофор; рсрф – регенерирующая складка ринофора; срф – складка ринофора; пунктирная линия – границы кармана ринофора.

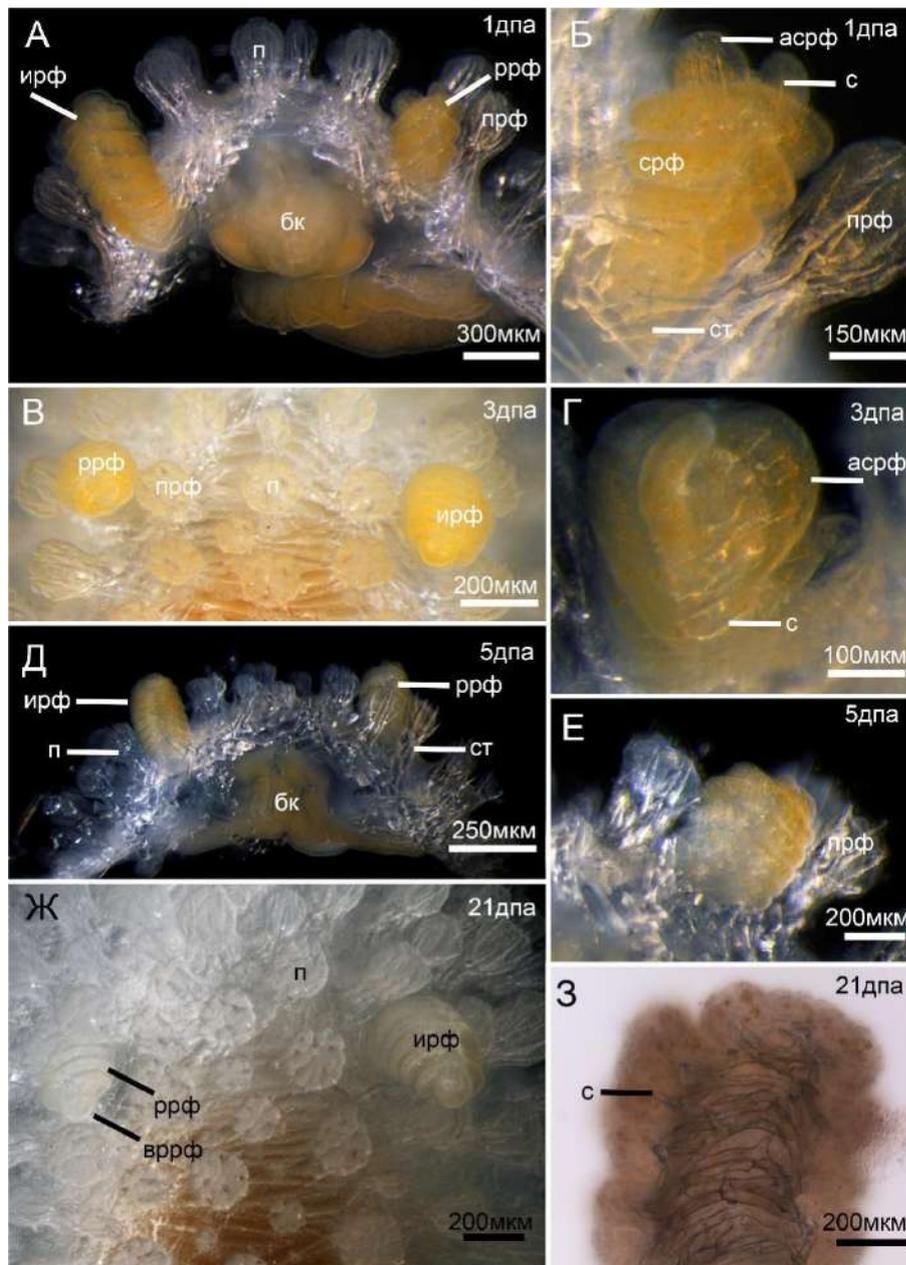


Рисунок 3.42. Восстановление ринофора после удаления его верхушки и трех складок (Световая микроскопия). А – фронтальный срез через переднюю часть тела. Слева – интактный ринофор, справа – ринофор на 1 день после ампутации (дпа) верхушки и трех складок (вид сбоку); Б – регенерирующий ринофор (1дпа), апикальные складки ринофора вывернуты в дорсальном направлении в сторону повреждения (вид сбоку); В – вид сверху на ринофоры 3 дпа. Слева – регенерирующий ринофор, апикальные складки принимают интактное положение, справа – интактный ринофор; Г – внешняя морфология регенерирующего ринофора на 3 дпа; Д – фронтальный срез через переднюю часть тела. Слева – интактный ринофор, справа – регенерирующий ринофор (5 дпа); Е – регенерирующий ринофор (5 дпа). Апикальные складки принимают нормальное положение; Ж – вид сверху на ринофоры спустя 21 день после ампутации. Слева – регенерирующий ринофор, справа – интактный ринофор. Видна сформированная верхушка ринофора; З – регенерирующий ринофор со спикулами внутри (21 дпа). Обозначения: асрф – апикальная складка ринофора; бк – буккальный комплекс; вррф – верхушка регенерирующего ринофора; ирф – интактный ринофор; п – папилла; прф – папиллы ринофора; ррф – регенерирующий ринофор; с – спикула; сфр – спикулы ринофора; ст – спикулы тела.

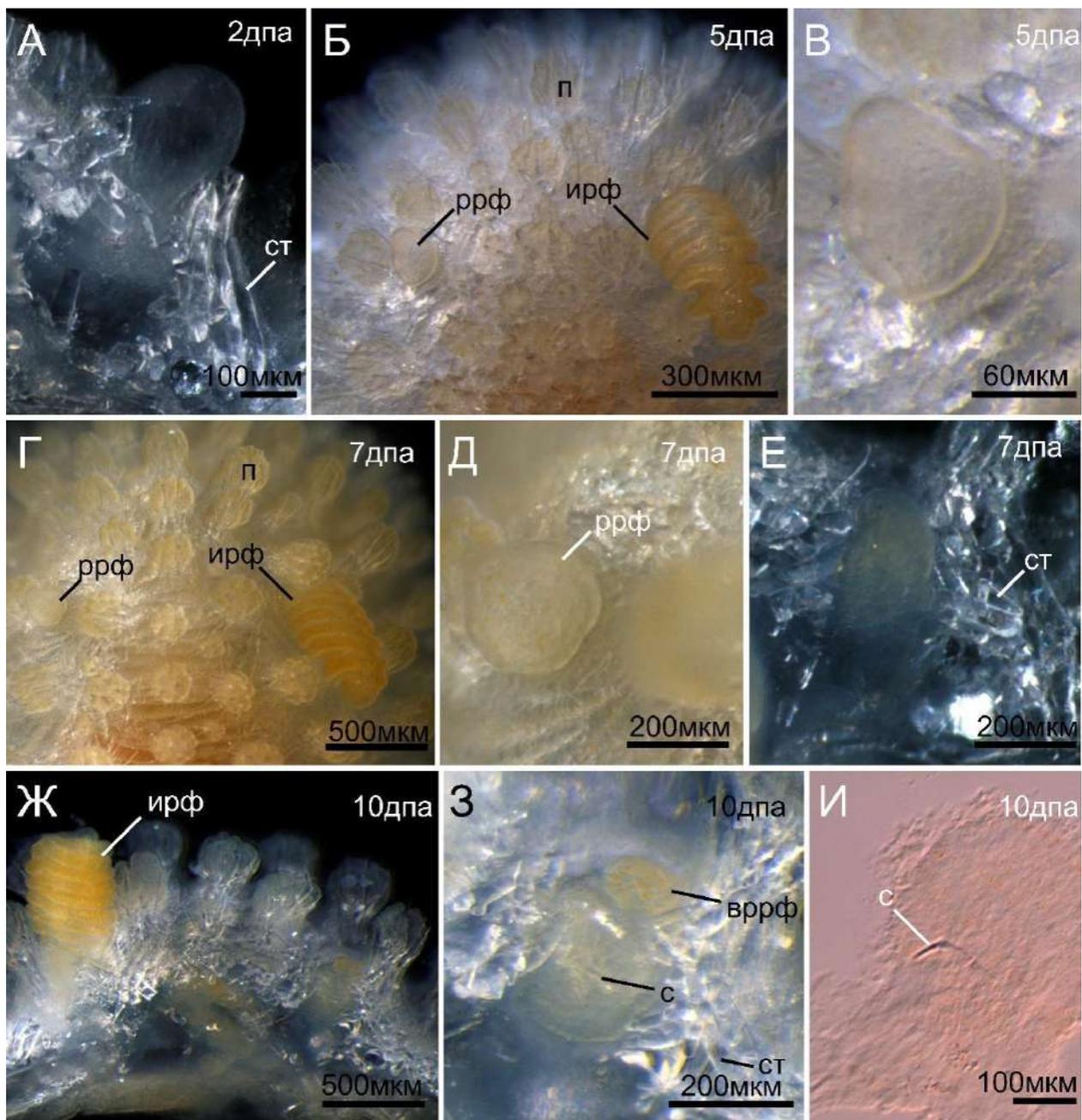


Рисунок 3.43. Последовательность восстановления ринофора после удаления складчатого клавуса (Световая микроскопия). А – внешний вид регенерата на 2 день после ампутации (дпа), вид спереди; Б, В – регенерационная почка на поверхности регенерата и интактный ринофор, вид с дорсальной стороны; Г–Е – внешний вид ринофора на 7 дпа, вид с дорсальной стороны (Г, Д) и спереди (Е); Ж–З – внешний вид регенерата с первыми складками, обособленной верхушкой и спикулами внутри; И – спикула регенерата на 10 дпа. Обозначения: vrrf – верхушка регенерирующего ринофора; ирф – интактный ринофор; п – папилла; ррф – регенерирующий ринофор; с – спикулы; ст – спикулы тела.

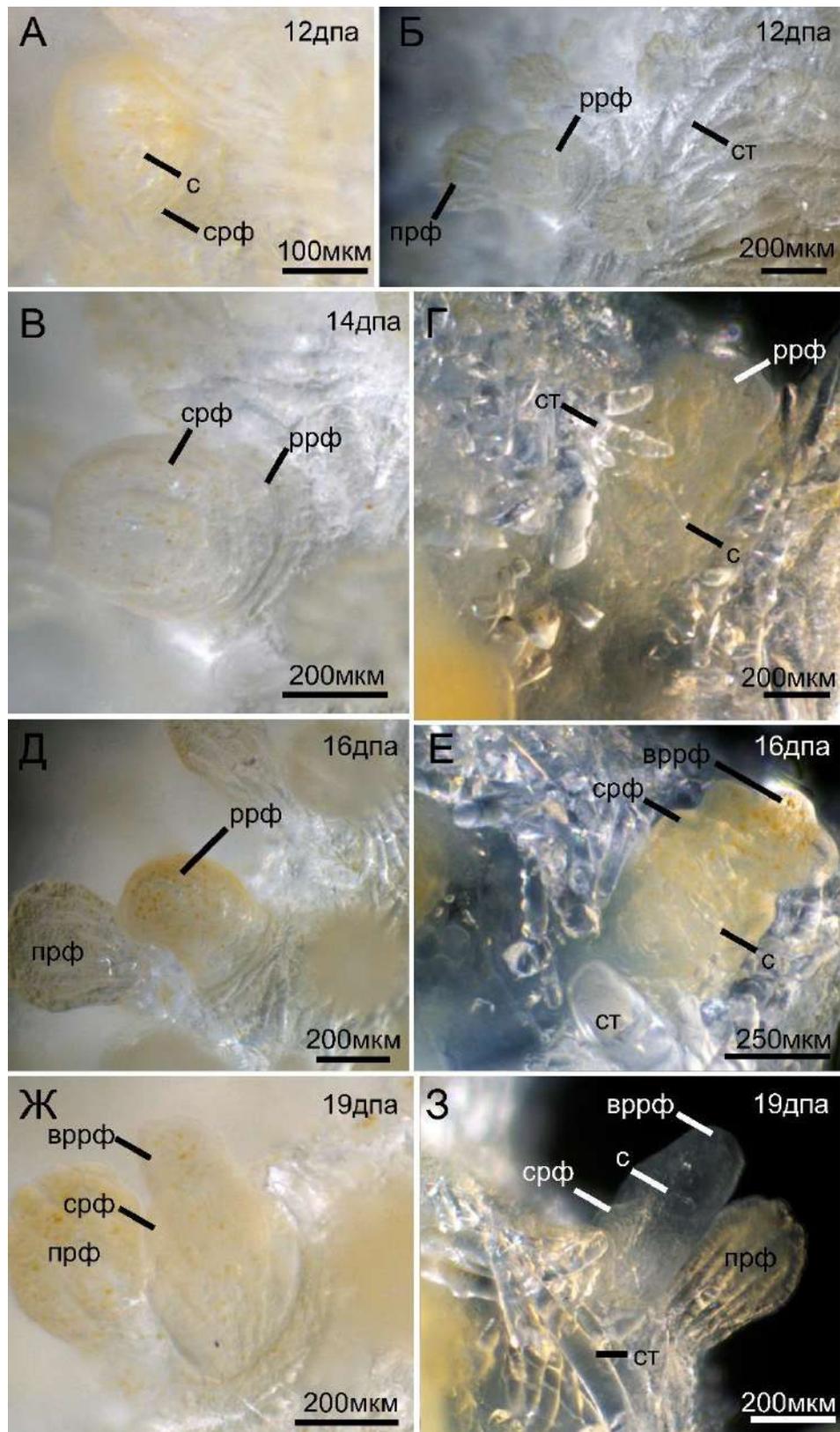


Рисунок 3.44. Внешняя морфология регенирующего ринофора после удаления складчатого клавуса на 12-19 день после ампутации (дпа) (Световая микроскопия). Происходит увеличение количества складок ринофора и спикул внутри него. А, Б, В, Д, Е, Ж – вид с дорсальной стороны; Г, З, И – вид спереди. Обозначения: ввррф – верхушка регенирующего ринофора; пррф – папиллы ринофора; ррф – регенирующий ринофор; с – спикула; срф – складки ринофора; ст – спикулы тела.

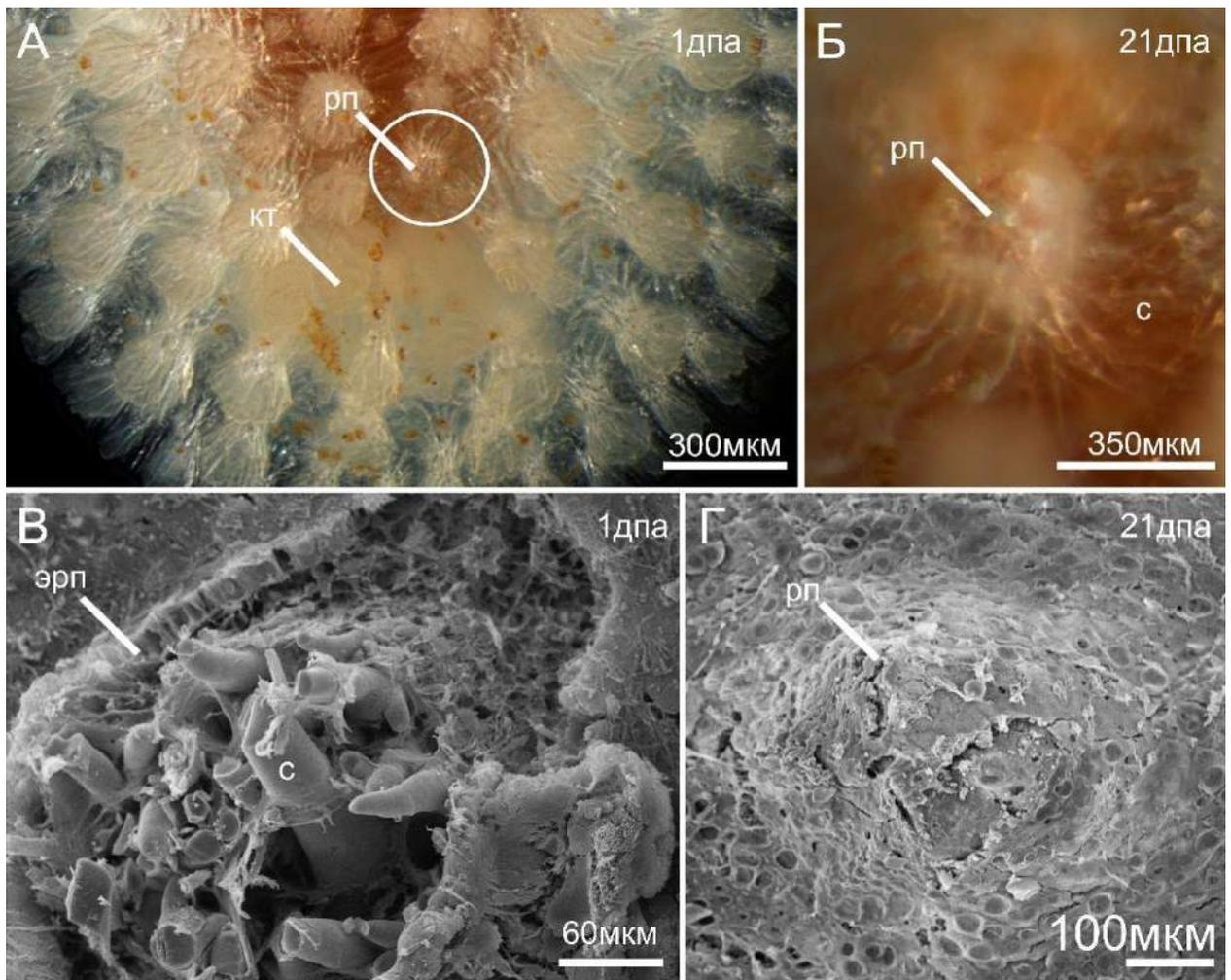


Рисунок 3.45. Основание папиллы околожаберной области после ее полного удаления (А, Б – световая микроскопия; В, Г – СЭМ). А, В – поврежденная папилла в околожаберной области; Б, Г – Эпителизация раны, восстановление папиллы не происходит. Обозначения: кт – ктении; рп – регенерирующая папилла; с – спикулы; эрп – эпителий регенерирующей папиллы.

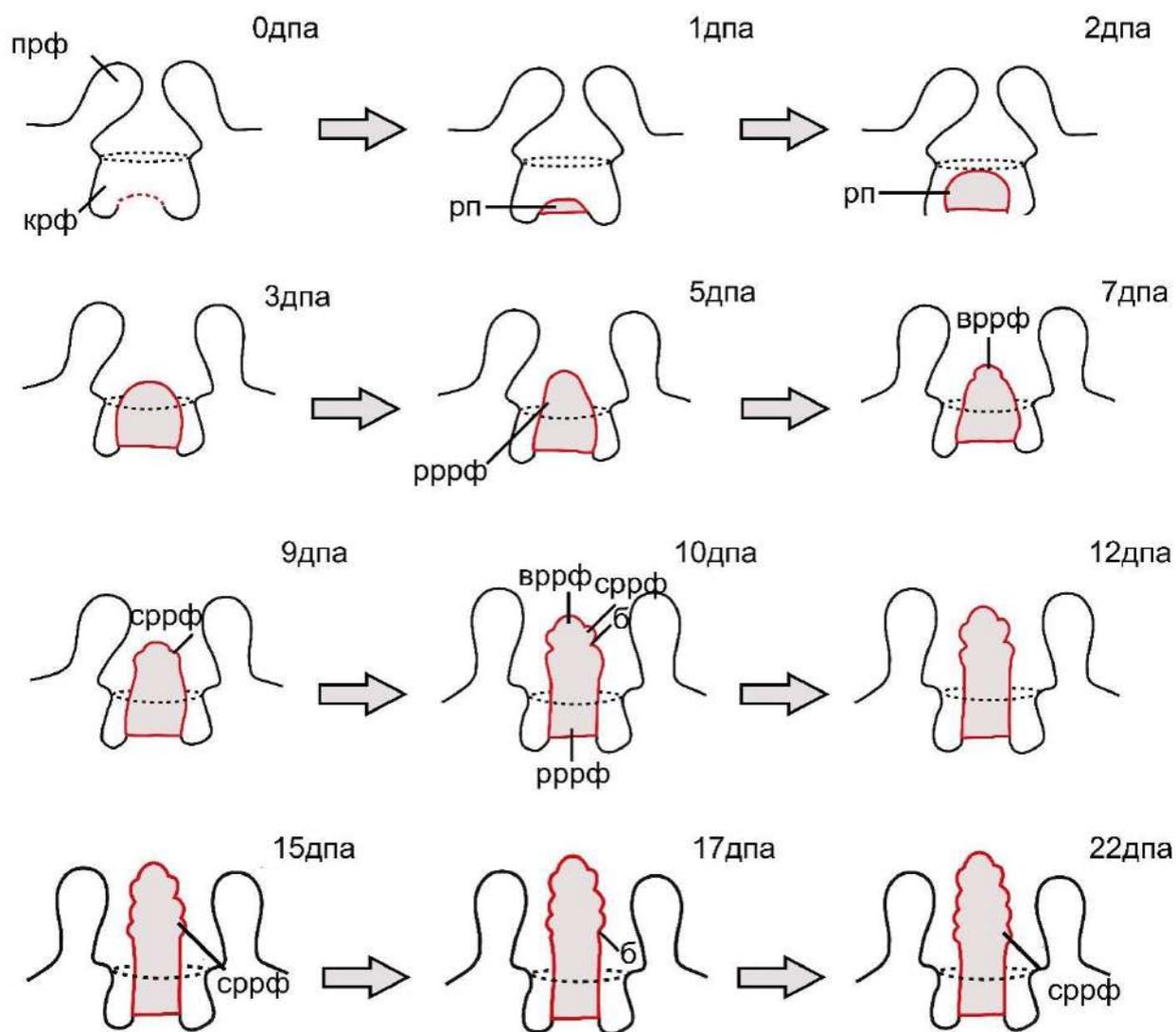


Рисунок 3.46. Схема восстановления ринофора *Onchidoris muricata* после удаления ринофора целиком. Обозначения: б – борозда; вррф – верхушка регенерирующего ринофора; крф – карман ринофора; прф – папилла ринофора; рп – регенерационная почка; рррф – рахис регенерирующего ринофора; сррф – складка регенерирующего ринофора; пунктирная линия – границы кармана ринофора.

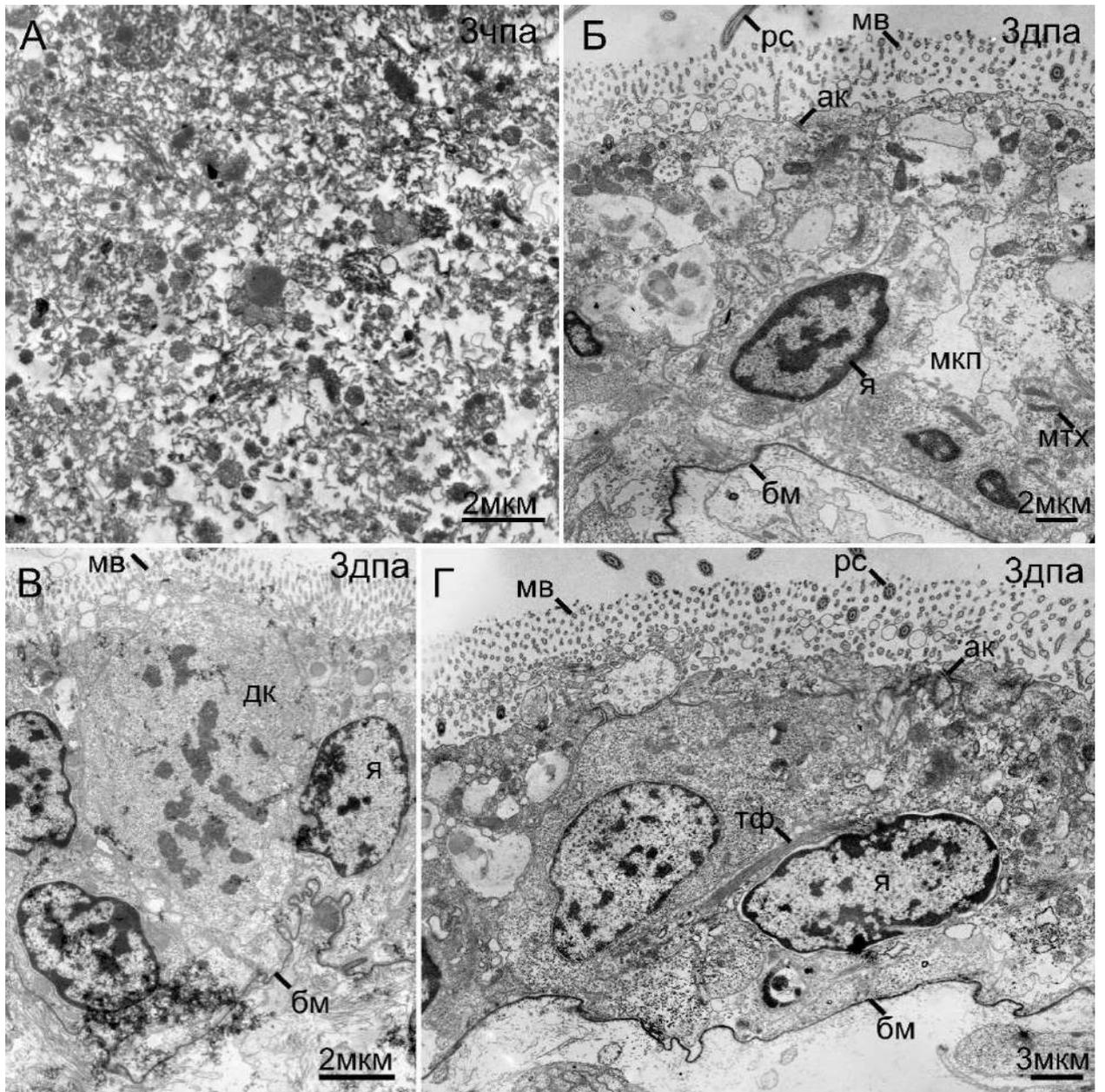


Рисунок 3.47. Особенности ультратонкого строения регенерирующего ринофора *Onchidoris muricata* (ТЭМ). А – спустя 3 часа после ампутации (чпа); Б–Г – спустя 3 дня после ампутации (3дпа). А – процессы деградации после повреждения; Б – раневой эпителий с межклеточными промежутками между эпителиальными клетками; В – процесс клеточного деления в эпителии регенерата; Г – фрагмент раневого эпителиа с тонофиламентами. Обозначения: ак – адгезивные контакты; бм – базальная мембрана; дк – делящаяся клетка; мв – микровилли; мкп – межклеточное пространство; мтх – митохондрия; rc – реснички; тф – тонофиламенты; я – ядро.

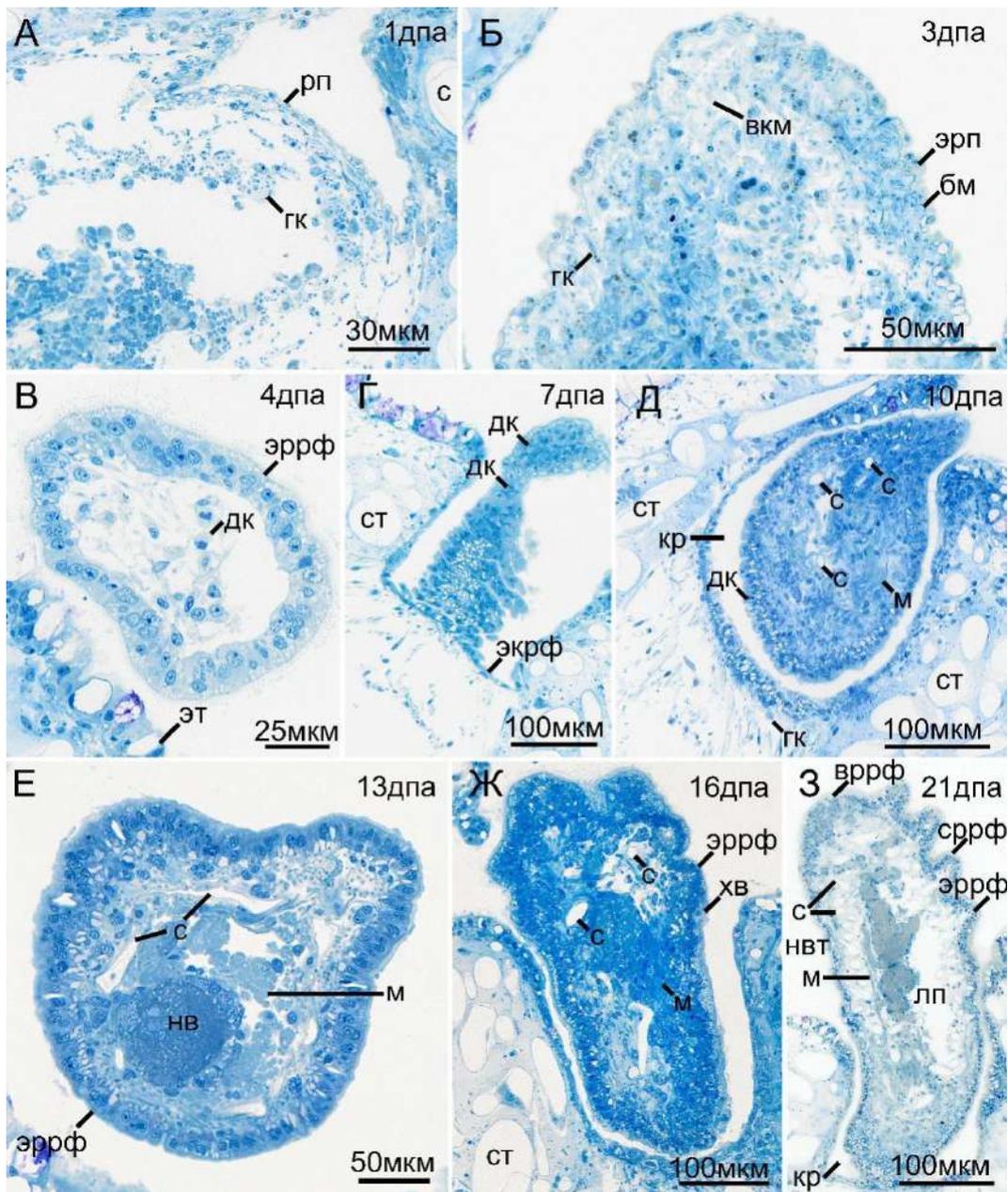


Рисунок 3.48. Особенности гистологии регенерирующего ринофора *Onchidoris muricata* (световая микроскопия). А – регенерационная почка на 1 день после ампутации (дпа), мигрирующие гранулированные амeboидные клетки к месту ранения; Б – регенерационная почка на 3 дпа, сформирована регенерационная пробка из внеклеточного матрикса; В – продольный срез через регенерат на 4 дпа. В просвете регенерата отмечены процессы клеточного деления; Г – фронтальный срез через стенку регенерата на 7 дпа. В эпителии отмечены многочисленные процессы деления; Д – фронтальный срез через регенерирующий ринофор со спикулами на 10 дпа; Е – косой срез через регенерат на 13 дпа; Ж – фронтальный срез через регенерат на 16 дпа; З – фронтальный срез через регенерат с 4 восстановленными складками ринофора на 21 дпа. Обозначения: бм – базальная мембрана; вкм – внеклеточный матрикс; вррф – верхушка ринофора; гк – гранулированная клетка; дк – делящиеся клетки; кр – карман ринофора; лп – лимфатическая полость регенерирующего ринофора; м – мышцы; нв – нерв; рп – регенерационная почка; с – спикула; сррф – складка ринофора; ст – спикулы тела; экрф – эпителий кармана ринофора; эрп – эпителий регенерационной почки; эррф – эпителий регенерирующего ринофора; эт – эпителий тела.

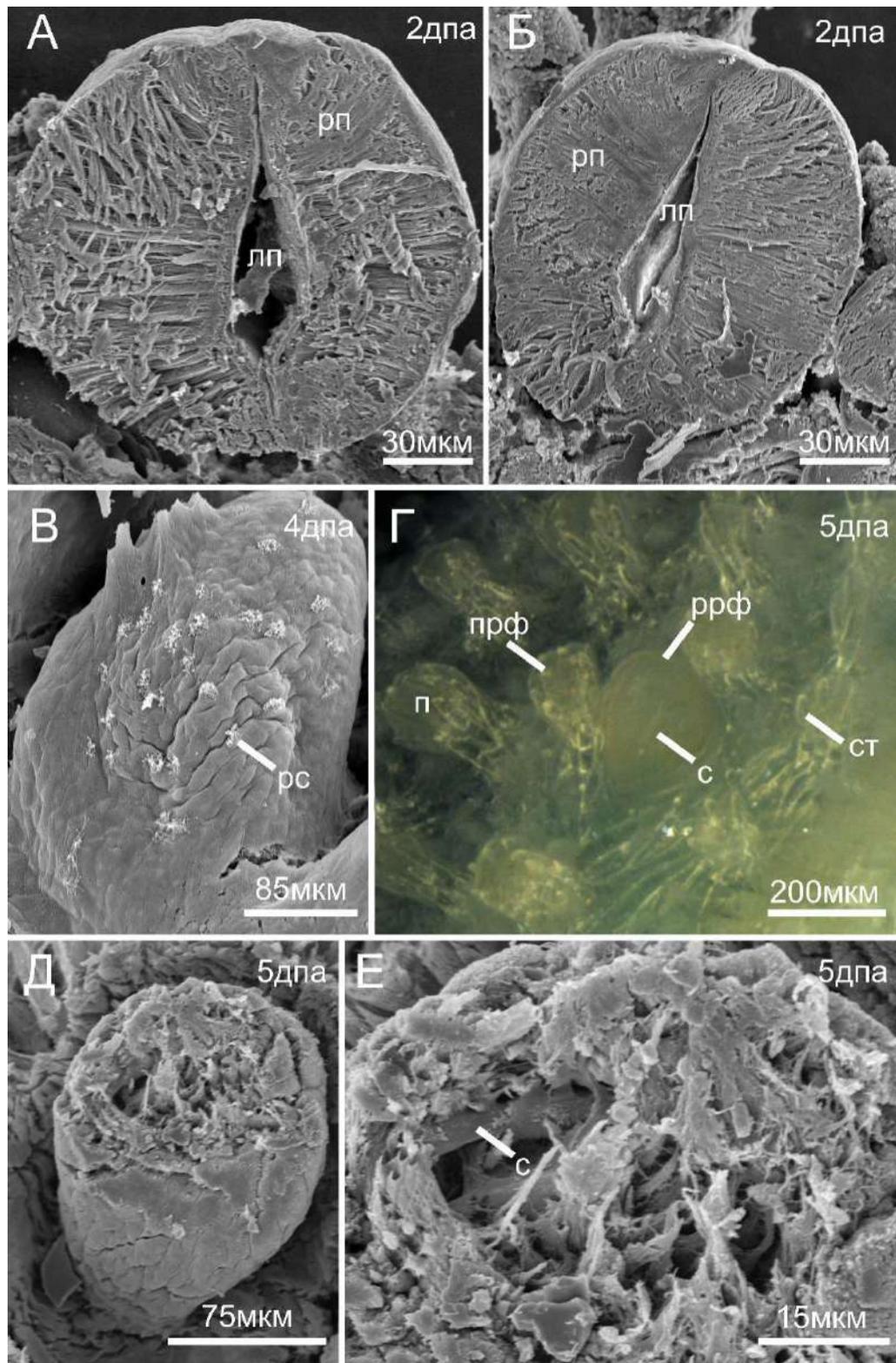


Рисунок 3.49. Морфология регенирующего ринофора (СЭМ, Г – световая микроскопия). А, Б – продольный срез через регенирующийся ринофор на 2 день после ампутации (дпа); В – внешняя морфология регенирующегося ринофора с пучками ресничек (4 дпа); Г – спикула в регенирующем ринофоре (5 дпа); Д – слом верхушки регенирующегося ринофора (5 дпа); Е – спикула в апикальной части регенирующегося ринофора (5 дпа). Обозначения: лп – лимфатическая полость; п – папилла; прф – папилла ринофора; рп – регенерационная почка; ррф – регенирующийся ринофор; рс – реснички; с – спикулы; ст – спикула тела.

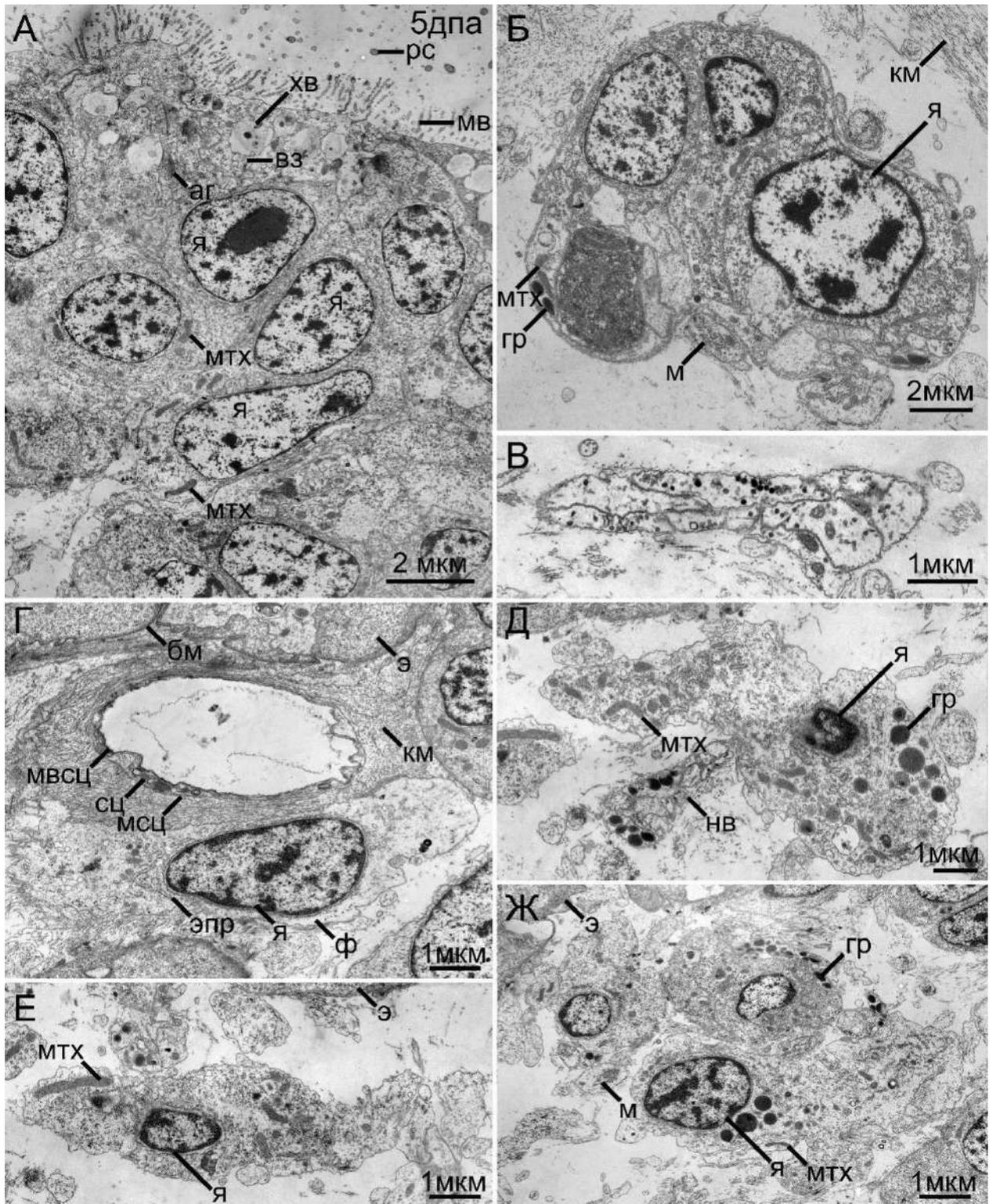


Рисунок 3.50. Особенности ультраструктурного строения регенерирующего ринофора *Onchidoris turicata* на 5 день после ампутации (ТЭМ). А – столбчатый эпителий регенерата; Б – элементы нервной системы регенерата; В – отросток нерва регенерата; Г – спикула регенерата; Д–Ж – амебоидная клетка с большим количеством митохондрий и электронноплотными гранулами. Обозначения: аг – аппарат Гольджи; бм – базальная мембрана; в3 – везикулы; гр – гранулы; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мв – микровилли; мвсц – мембрана вакуоли склероцита; мсц – мембрана склероцита; мтх – митохондрии; нв – нерв; рс – реснички; сц – склероцит; хв – хитиновые веретена; ф – фибробласт; э – эпителий; эпр – эндоплазматический ретикулум; я – ядро.

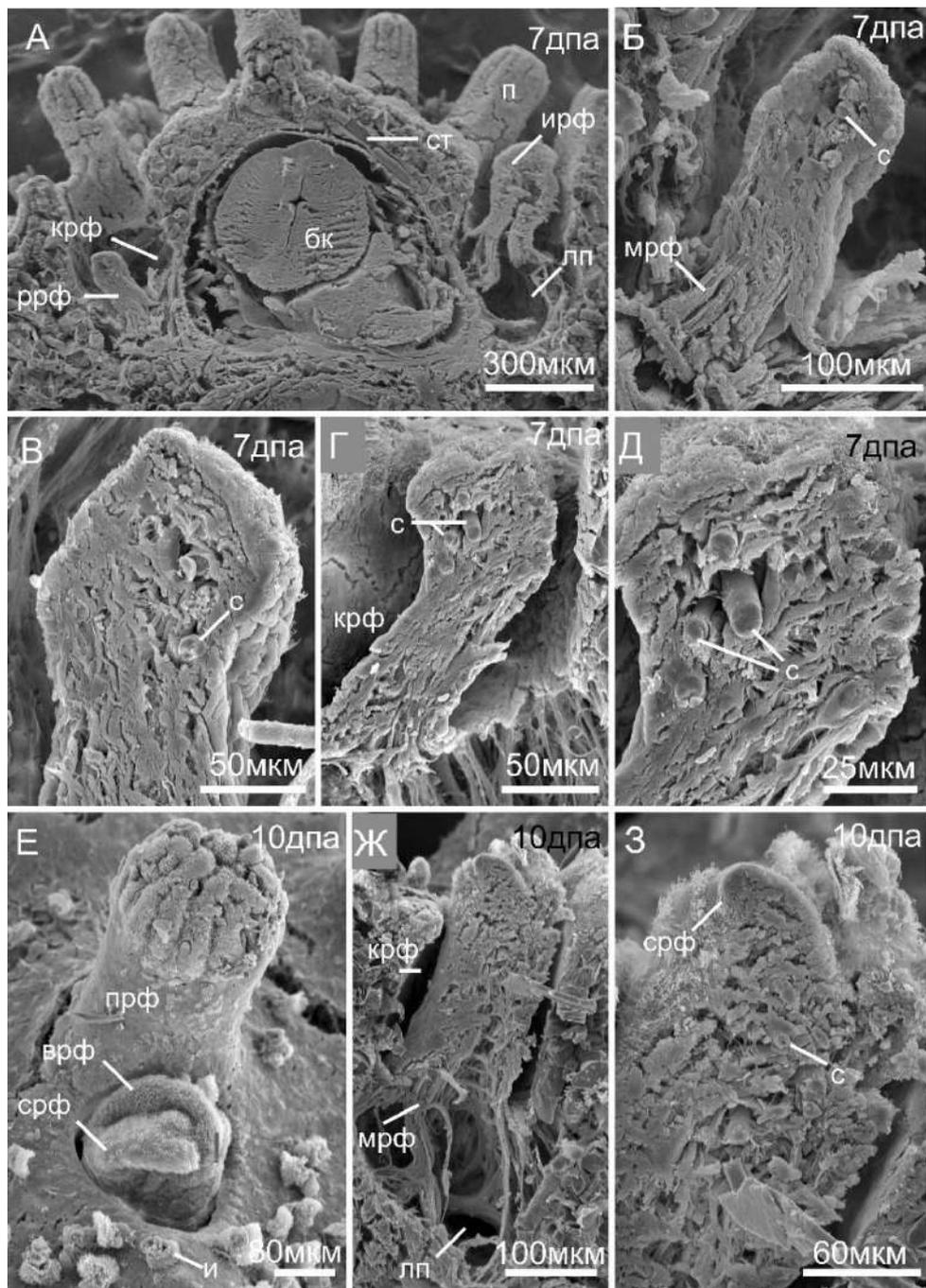


Рисунок 3.51. Морфология регенирующего ринофора (СЭМ). А–Д – 7 дней после ампутации (дпа); Е–Ж – 10 дпа. А – продольный срез через регенирующий и интактный ринофоры; Б–Д – продольный срез регенирующего ринофора с плотным мышечным слоем и спикулами в апикальной части; Е – внешняя морфология регенирующего ринофора с первыми складками и оформленной верхушкой; Ж – продольный срез регенирующего ринофора с лимфатической полостью в основании; З – продольный срез апикальной части ринофора со спикулами. Обозначения: бк – буккальный комплекс; врф – верхушка регенерата; и – инфузория; ирф – интактный ринофор; крф – карман ринофора; лп – лимфатическая полость; мрф – мышцы регенирующего ринофора; п – папилла; прф – папиллы регенирующего ринофора; ррф – регенирующий ринофор; с – спикула; срф – складка регенерата; ст – спикулы тела.

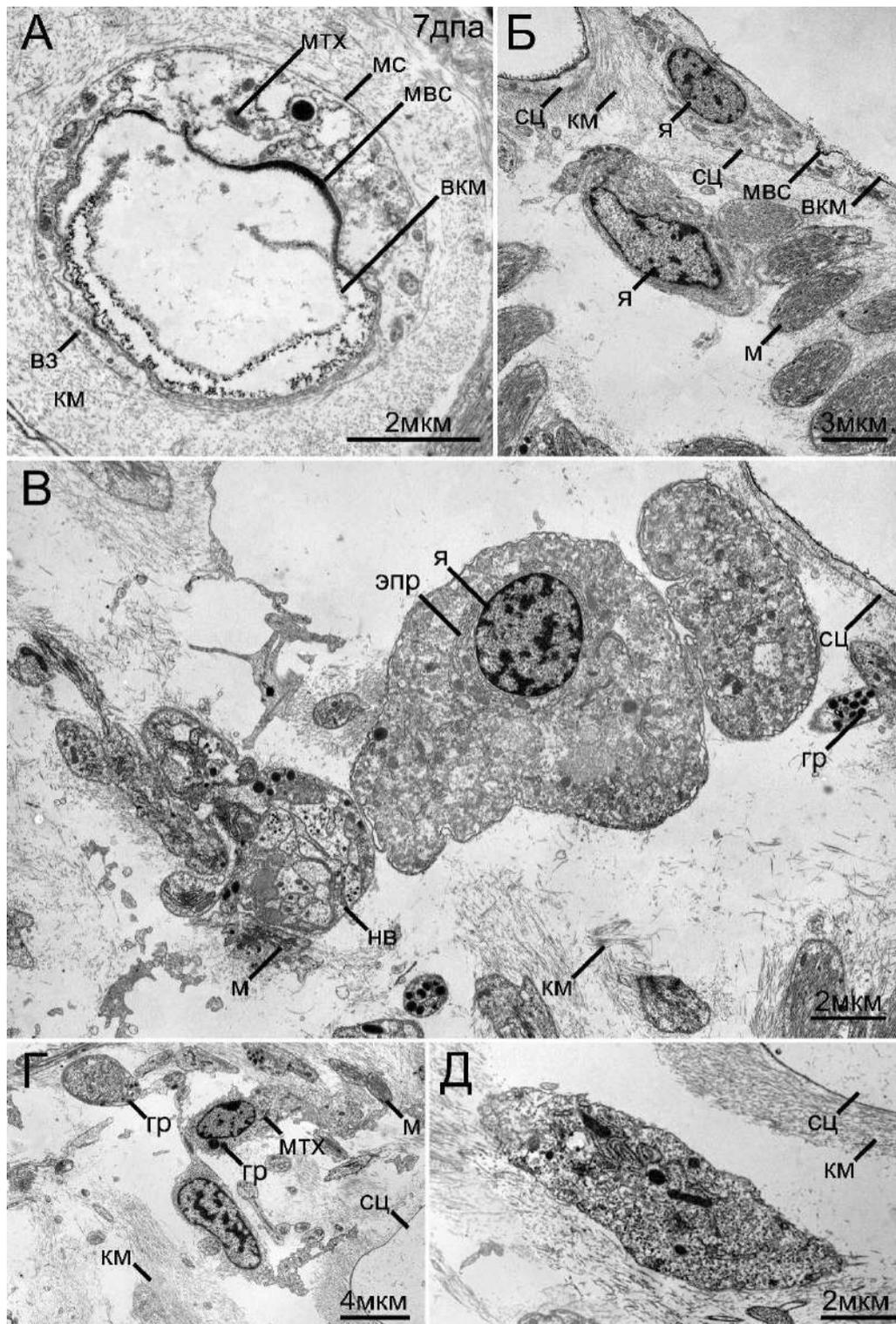


Рисунок 3.52. Склерциты и их окружение в регенирующем ринофоре *Onchidoris muricata* на 7 день после ампутации (ТЭМ). А – склерцит с осмиофильной обкладкой вакуоли и внутриклеточным содержимым в толще коллагенового матрикса; Б – мышечные элементы возле склерцита; В – нервные элементы и клеточные элементы возле спикулы; Г – клетки с многочисленными отростками; Д – клеточный элемент с высокой синтетической активностью, развитым эндоплазматическим ретикуломом и митохондриями. Обозначения: в3 – везикулы; вкм – внутриклеточный матрикс; гр – гранулы; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мвс – мембрана вакуоли склерцита; мс – мембрана склерцита; мтх – митохондрия; нв – нервные элементы; сц – склерцит; эпр – эндоплазматический ретикулум; я – ядро.

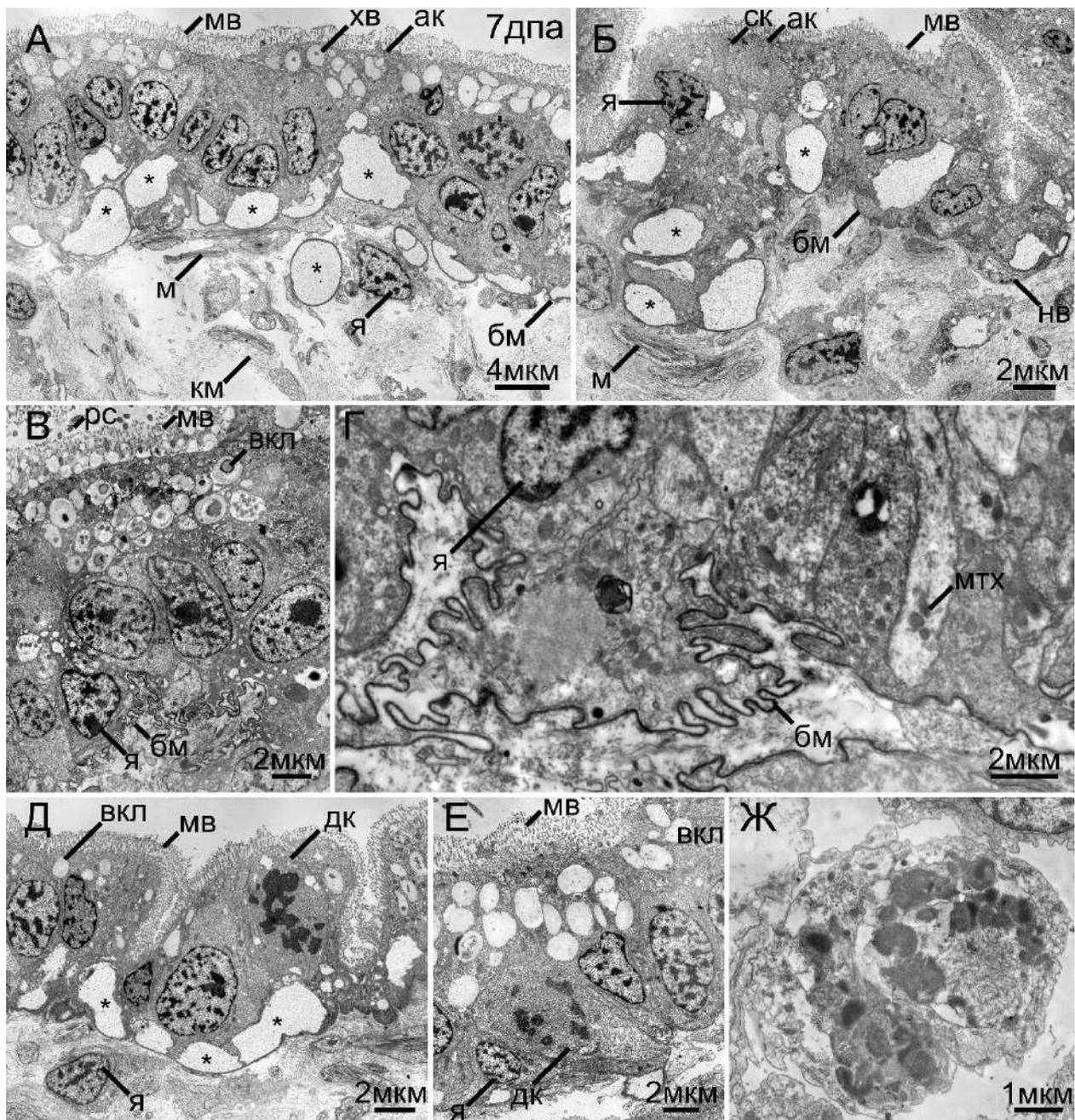


Рисунок 3.53. Особенности ультратонкого строения регенерирующего ринофора *Onchidoris turicata* на 7 день после ампутации (ТЭМ). А – стенка тела регенерата. Эпителий несет большое количество Икс клеток (отмечены звездочкой); Б – фрагмент эпителия с инвагинацией скопления Икс клеток в субэпидермальное пространство; В, Г – фрагмент эпителия с изрезанной базальной пластинкой; Д, Е – клеточные деления в эпителии регенерата; Ж – процессы клеточной деградации в регенерате. Обозначения: ак – адгезивные контакты; бм – базальная мембрана; вкл – включения; дк – делящиеся клетки; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мв – микровилли; нв – нерв; рс – реснички; ск – септированные контакты; хв – хитиновые веретена; я – ядро.

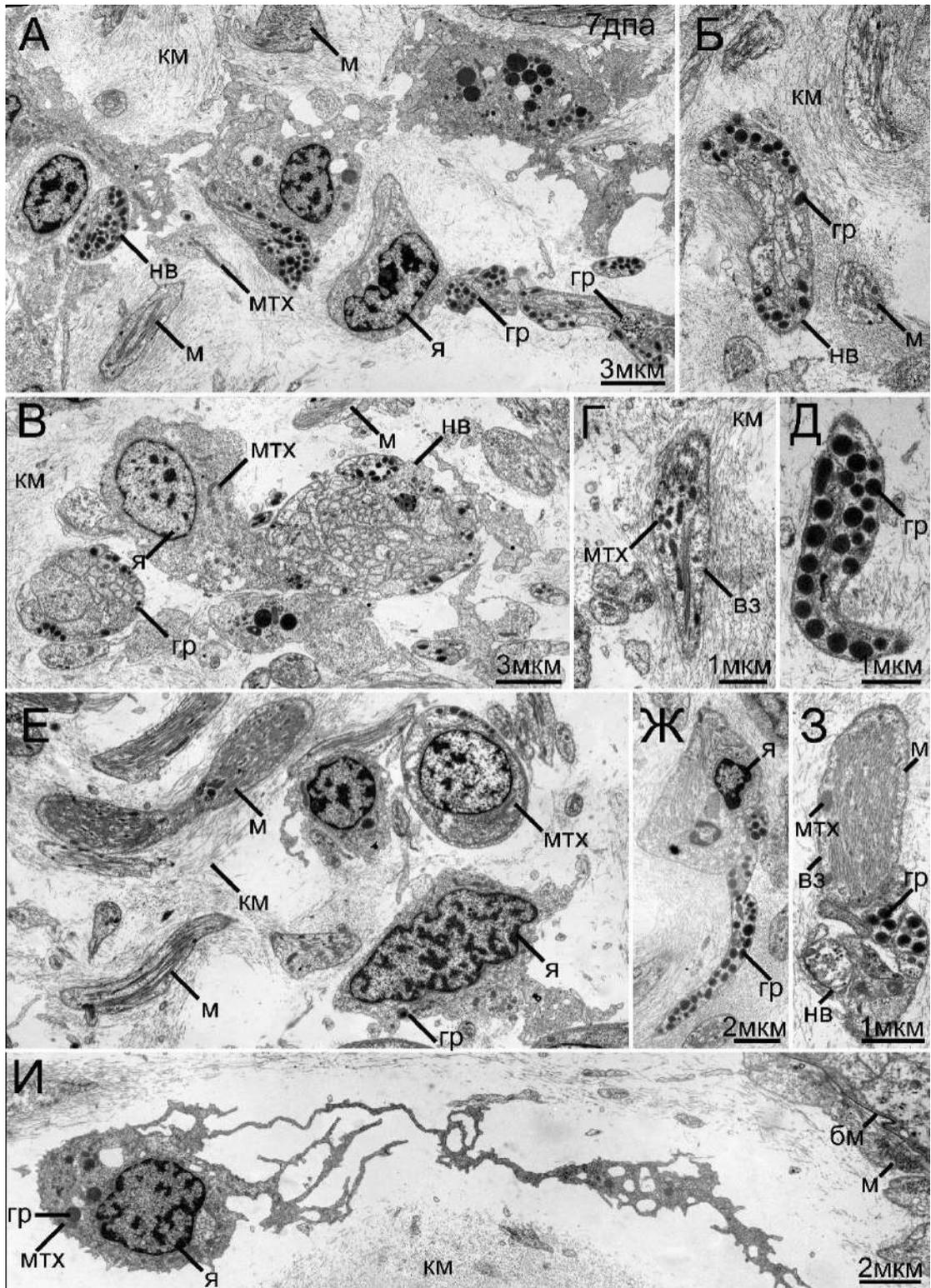


Рисунок 3.54. Клеточные элементы в регенерирующем ринофоре *Onchidoris muricata* на 7 день после ампутации (ТЭМ). А – амeboидные клетки с электронно-плотными гранулами, мышечные и нервные элементы в просвете ринофора; Б, З – мышечные и нервные элементы, погруженные в толщу коллагенового матрикса; В – нерв регенерата; Г – миоцит с митохондриями; Д – отросток с электронно-плотными гранулами; Е – мышечные элементы и амeboидные клетки с отростками; Ж – амeboидные клетки с электронно-плотными гранулами; И – клетка с тонкими выростами. Обозначения: бм – базальная мембрана; в3 – везикулы; гр – гранулы; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мтх – митохондрии; нв – нерв; я – ядро.

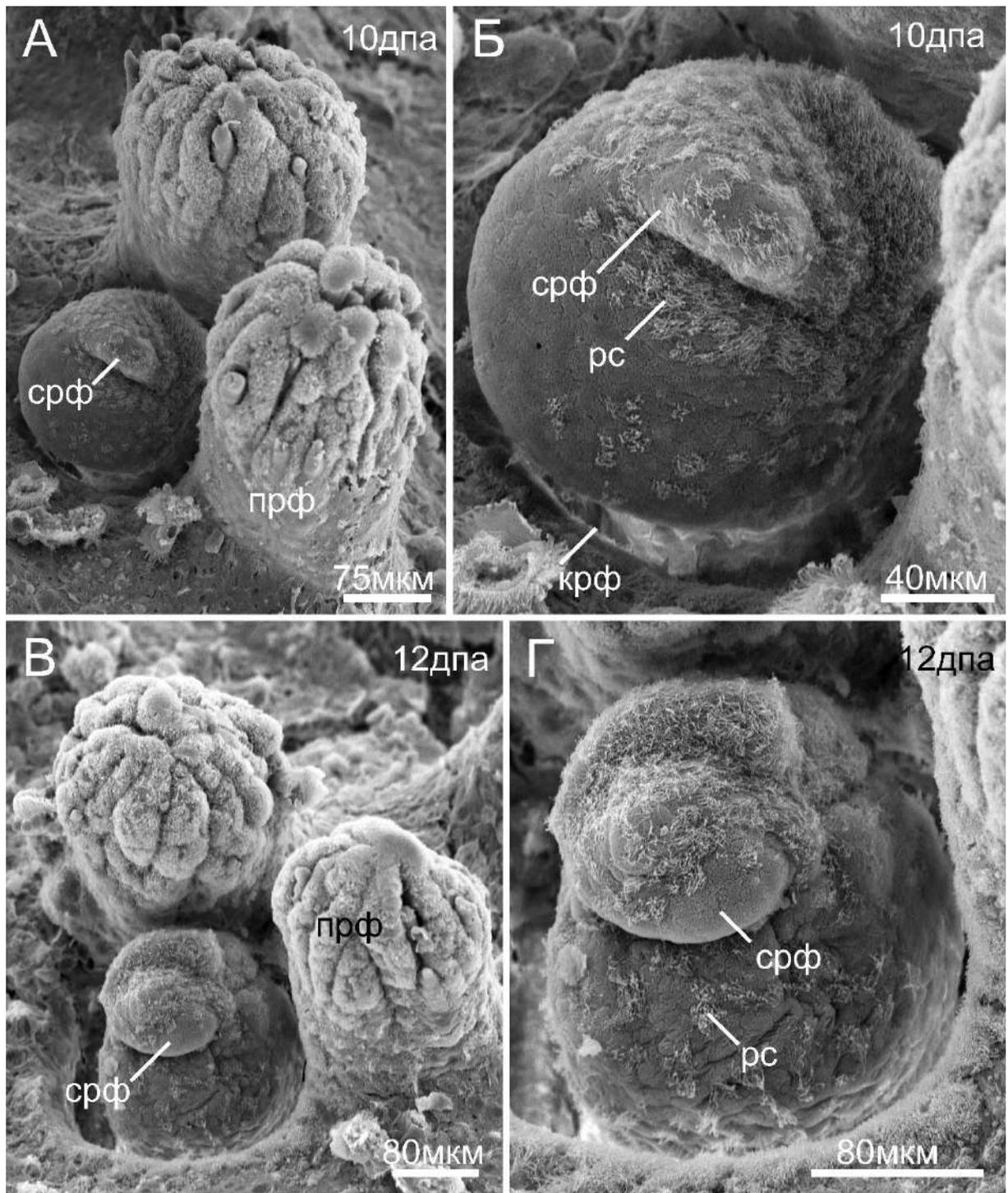


Рисунок 3.55. Морфология регенерирующего ринофора (СЭМ). А – внешний вид регенерата с папиллами ринофора, 10 дней после ампутации; Б – регенерат со складками в апикальной части, 10 дней после ампутации; В – внешний вид регенерата с папиллами ринофора, 12 дней после ампутации; Г – регенерат со складками в апикальной части, 12 дней после ампутации. Апикальная часть регенерирующего ринофора со складками, обильно покрытая ресничками. Обозначения: крф – карман ринофора; прф – папилла ринофора; рс – реснички; срф – складка регенерирующего ринофора.

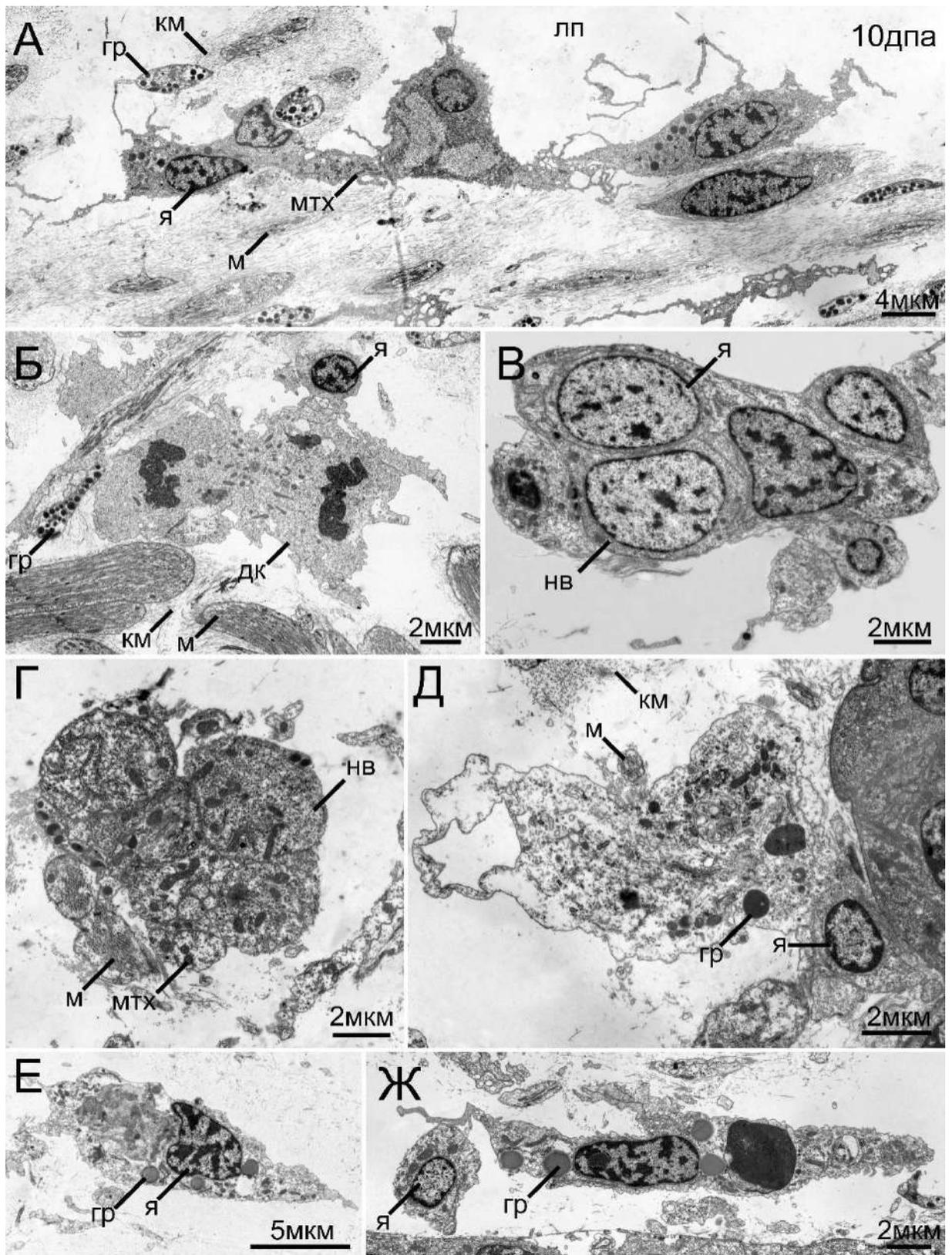


Рисунок 3.56. Особенности ультратонкого строения, клеточные элементы в регенерирующем ринофоре *Onchidoris muricata* на 10 день после ампутации (ТЭМ). А – клетки с выростами ограничивают лимфатическую полость; Б – клеточные деления в полости регенерата; В, Г – нервные элементы регенерата; Д–Ж – амебоидные клетки с электронно-плотными гранулами. Обозначения: гр – гранулы; дк – делящаяся клетка; км – коллагеновый матрикс; лп – лимфатическая полость; м – мышцы; мтх – митохондрии; я – ядро.

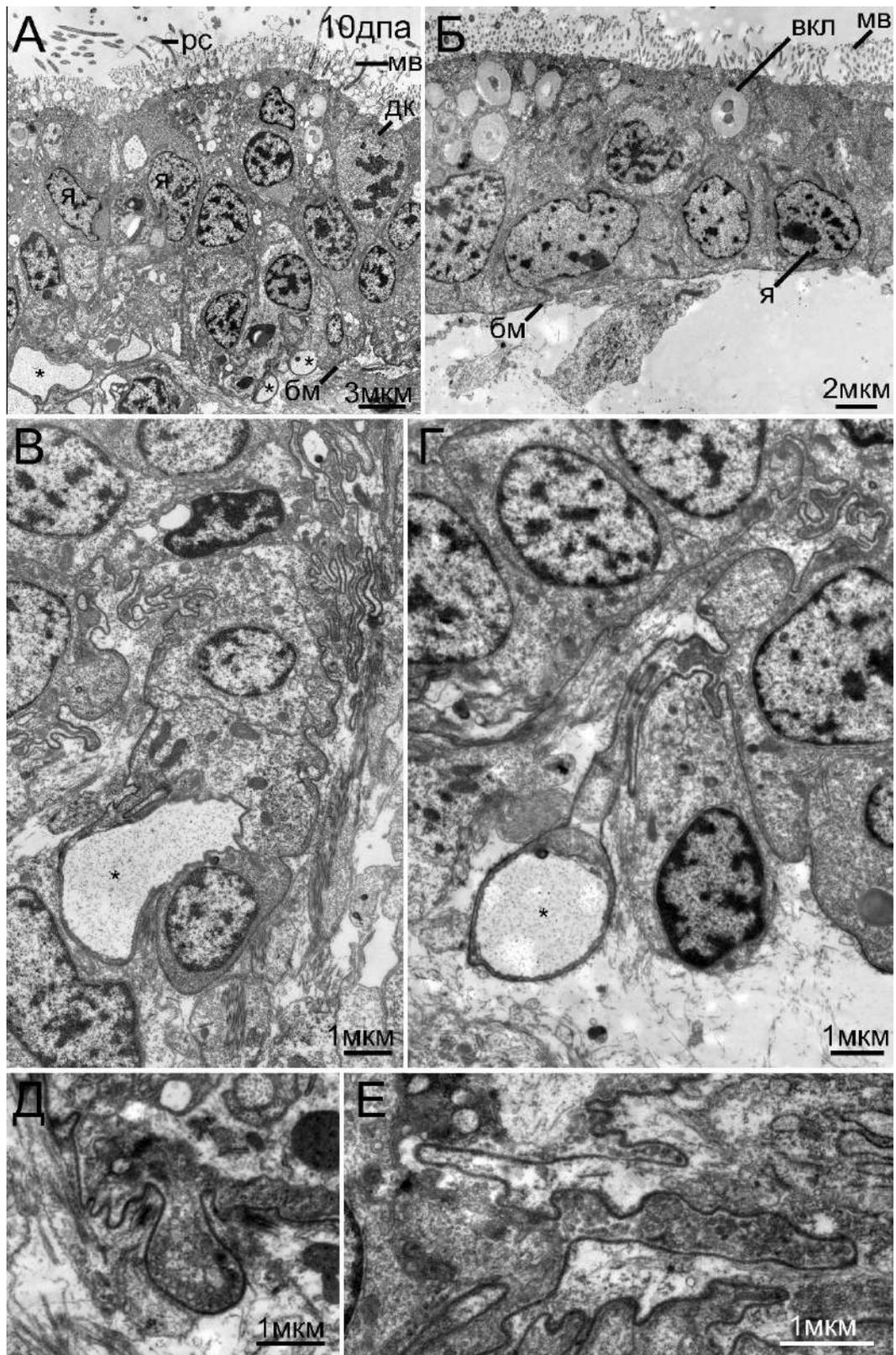


Рисунок 3.57. Особенности ультраструктурного строения эпителия регенерирующего ринофора *Onchidoris muricata* на 10 день после ампутации (ТЭМ). А – фрагмент псевдостратифицированного эпителия с делящимися клетками; Б – столбчатые клетки эпителия; В, Г – инвагинации Икс клеток (отмечены звездочкой) на мембранных тяжах в субэпидермальное пространство, изрезанная базальная пластинка; Д, Е – участки с многочисленными пузырьками возле изрезанной базальной пластинки. Обозначения: бм – базальная мембрана; вкл – включения; дк – делящаяся клетка; мв – микровилли; рс – ресничка; я – ядро.

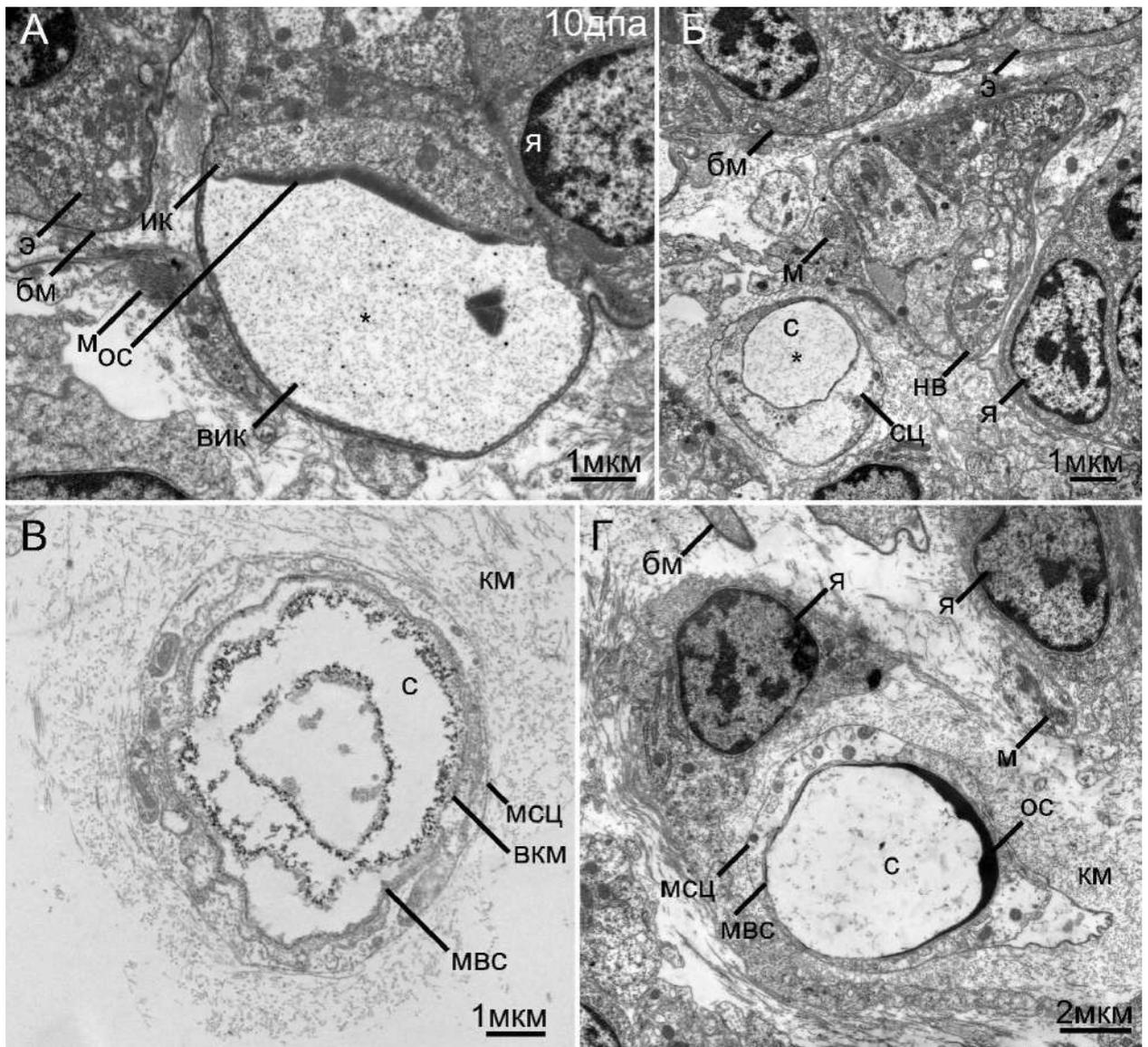


Рисунок 3.58. Склерциты в регенирующем ринофоре *Onchidoris muricata* на 10 день после ампутации (ТЭМ). А – Икс клетка в базальной части эпителия, вакуоль с мелкозернистым содержимым имеет осмиофильную обкладку; Б – склероцит в субэпидермальном пространстве, вакуоль которого заполнена мелкозернистым содержимым; В – склероцит с внутриклеточным матриксом в виде концентрических слоев; Г – склероцит, мембрана вакуоли которого имеет осмиофильные участки. Обозначения: бм – базальная мембрана; вик – вакуоль Икс клетки с мелкозернистым содержимым; вкм – внутриклеточный матрикс; ик – Икс клетка; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мвс – мембрана вакуоли склероцита; мсц – мембрана склероцита; нв – нерв; ос – осмиофильный участок мембраны; с – спикула; сц – склероцит; э – эпителий; я – ядро; * обозначено мелкозернистое содержимое вакуоли Икс клетки и склероцитов.

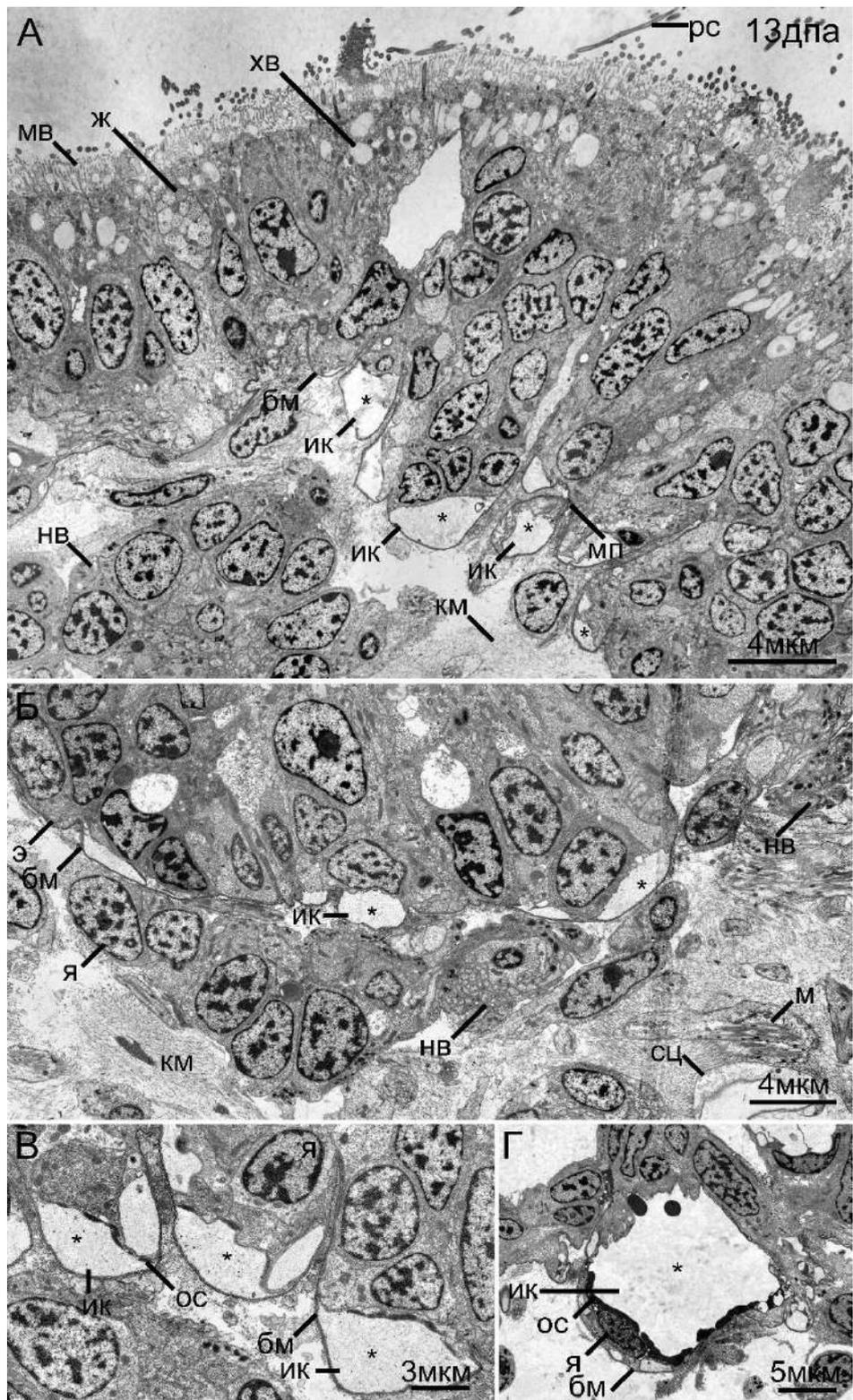


Рисунок 3.59. Особенности ультратонкого строения эпителия и Икс клеток регенерирующего ринофора *Onchidoris muricata* на 13 день после ампутации (ТЭМ). А – общий вид фрагмента эпителия регенерата; Б–Г – Икс клетки в базальной части эпителия. Обозначения: бм – базальная мембрана; ж – железа; ик – Икс клетки; км – коллагеновый матрикс; мв – микровиллы; мп – мембранная перетяжка; нв – нерв; ос – осмиофильный слой; рс – реснички; хв – хитиновые веретена; э – эпителий; я – ядро; * – мелкозернистое содержимое вакуоли Икс клеток.

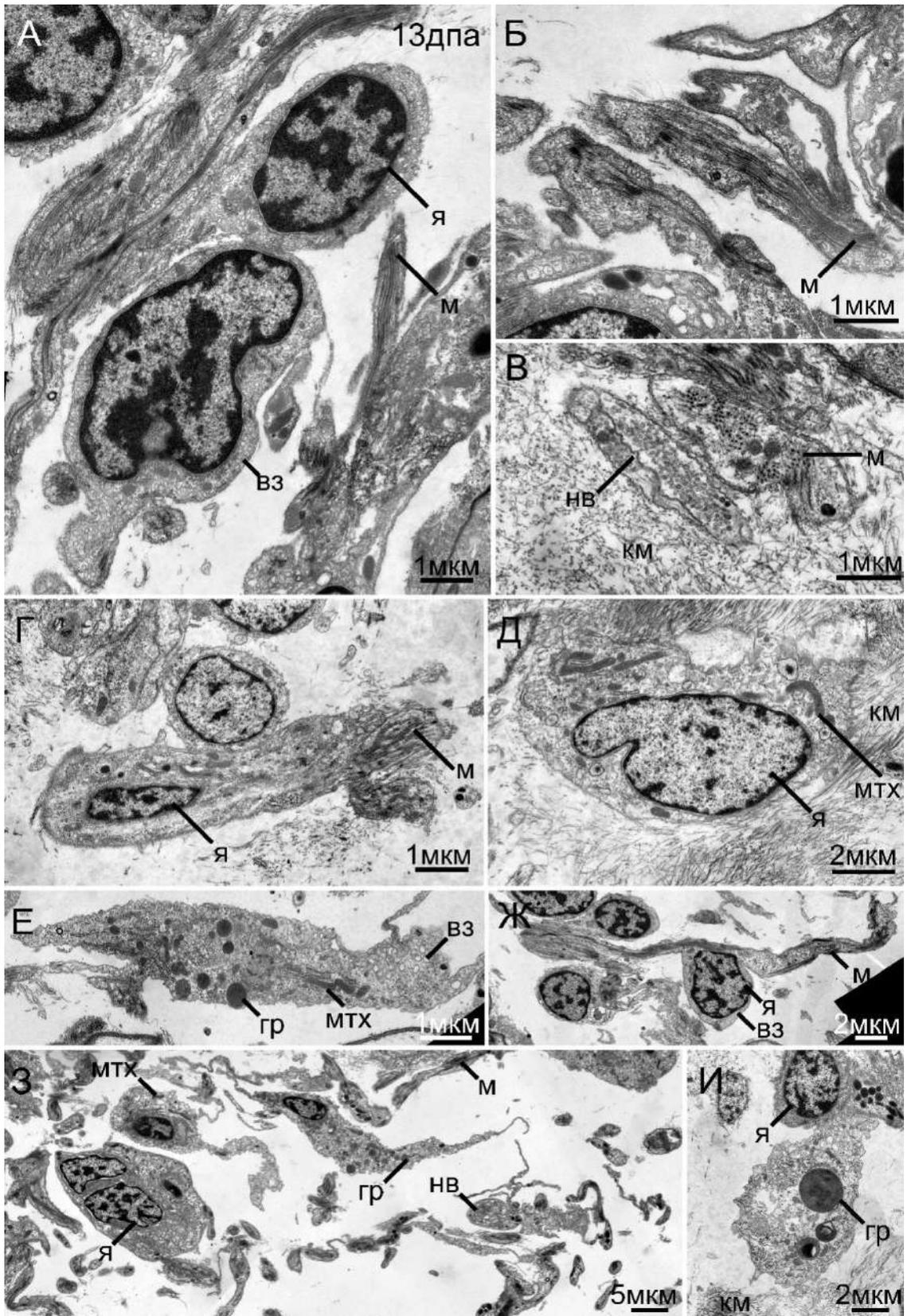


Рисунок 3.60. Клеточные элементы в регенерирующем ринофоре *Onchidoris muricata* на 13 день после ампутации (ТЭМ). А, Б, Ж – мышечные элементы регенерата; В, Г – нервы; Д – клетка в коллагеновом матриксе с развитыми митохондриями; Е, З, И – амебоидные клетки с длинными отростками и электронно-плотными гранулами. Обозначения: вз – везикулы; гр – гранулы; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мтх – митохондрии; нв – нервные элементы; я – ядро.

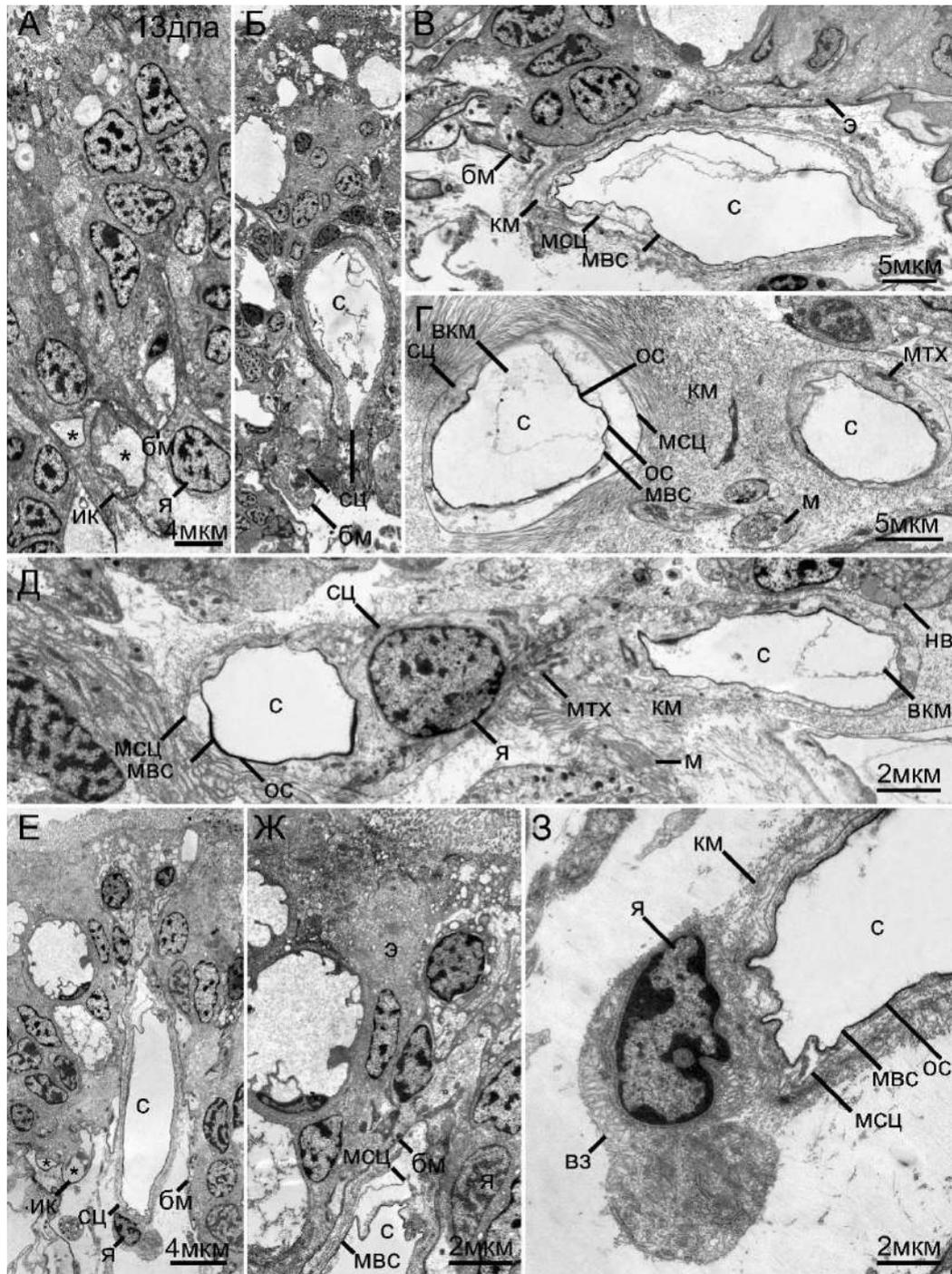


Рисунок 3.61. Склерциты в регенирующем ринофоре *Onchidoris muricata* на 13 день после ампутации (ТЭМ). А – фрагмент эпителия регенерата с Икс клетками (отмечены звездочкой) в базальной части; Б, В– склероцит возле эпителия; В – склероцит под базальной мембраной в субэпидермальном пространстве окружен коллагеновым матриксом; Д – субэпидермальная спикула вблизи нерва и мышечных элементов; Е – спикула под базальной мембраной в субэпидермальном пространстве, окруженная покровным эпителием; Ж, З – фрагмент склероцита на рис. Е; Ж – фрагмент склероцита возле эпителия; З – фрагмент перинуклеарной области склероцита. Обозначения: бм – базальная мембрана; вкм – внутриклеточный матрикс; ик – Икс клетка; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мвс – мембрана вакуоли склероцита; мсц – мембрана склероцита; мтх – митохондрии; нв – нерв; ос – осмиофильный слой; с – спикула; сц – склероцит; э – эпителий; я – ядро; * – мелкозернистое содержимое вакуоли Икс клеток.

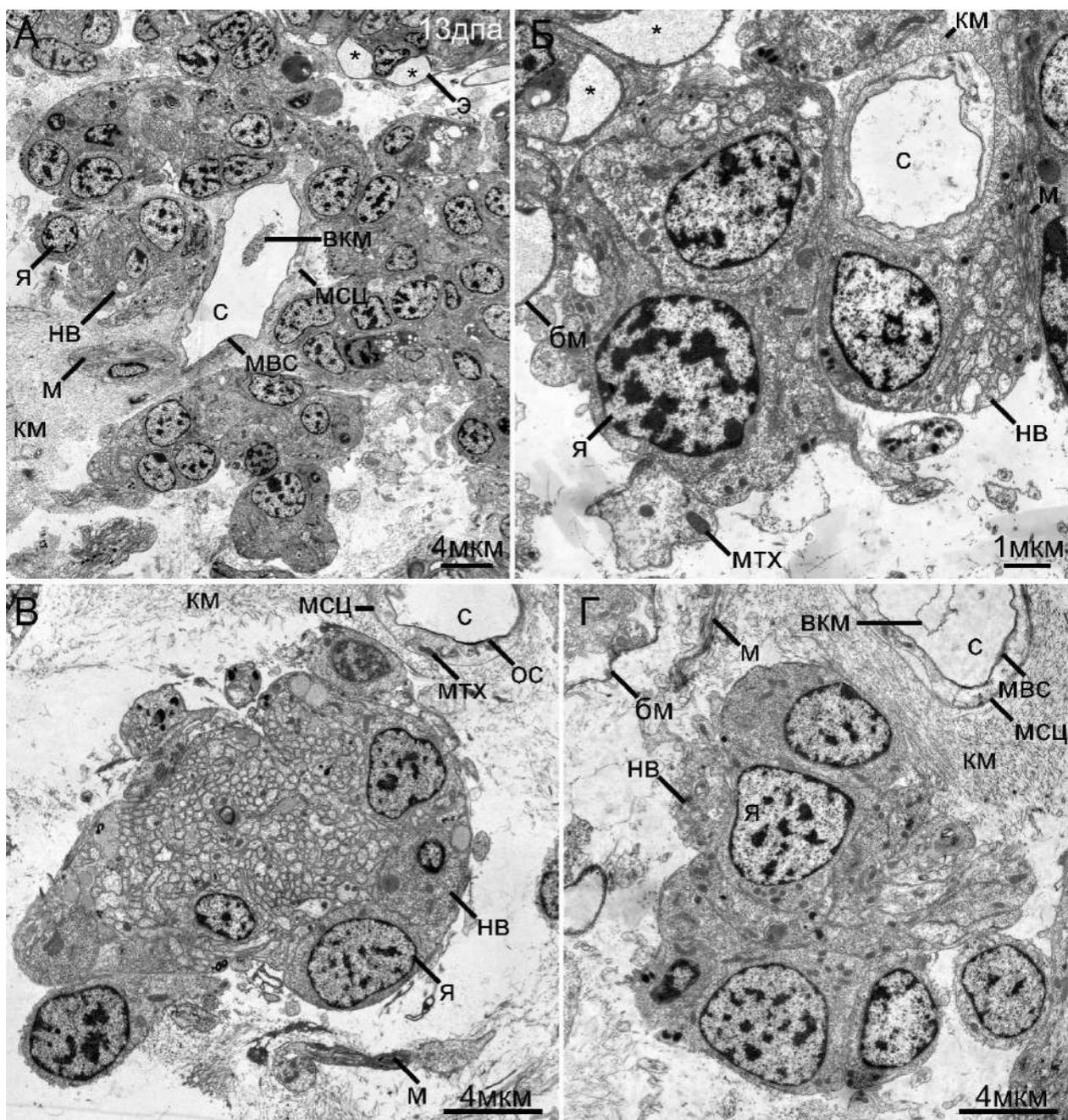


Рисунок 3.62. Ультратонкое строение триад, сформированных склероцитами, мышцами и нервами в регенирующем ринофоре на 13 день после ампутации (ТЭМ). Обозначения: бм – базальная мембрана; вкм – внутриклеточный матрикс; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мвс – мембрана вакуоли склероцита; мсц – мембрана склероцита; мтх – митохондрии; нв – нерв; ос – осмиофильный слой; с – спикула; э – эпителий; я – ядро; * – Икс клетки.

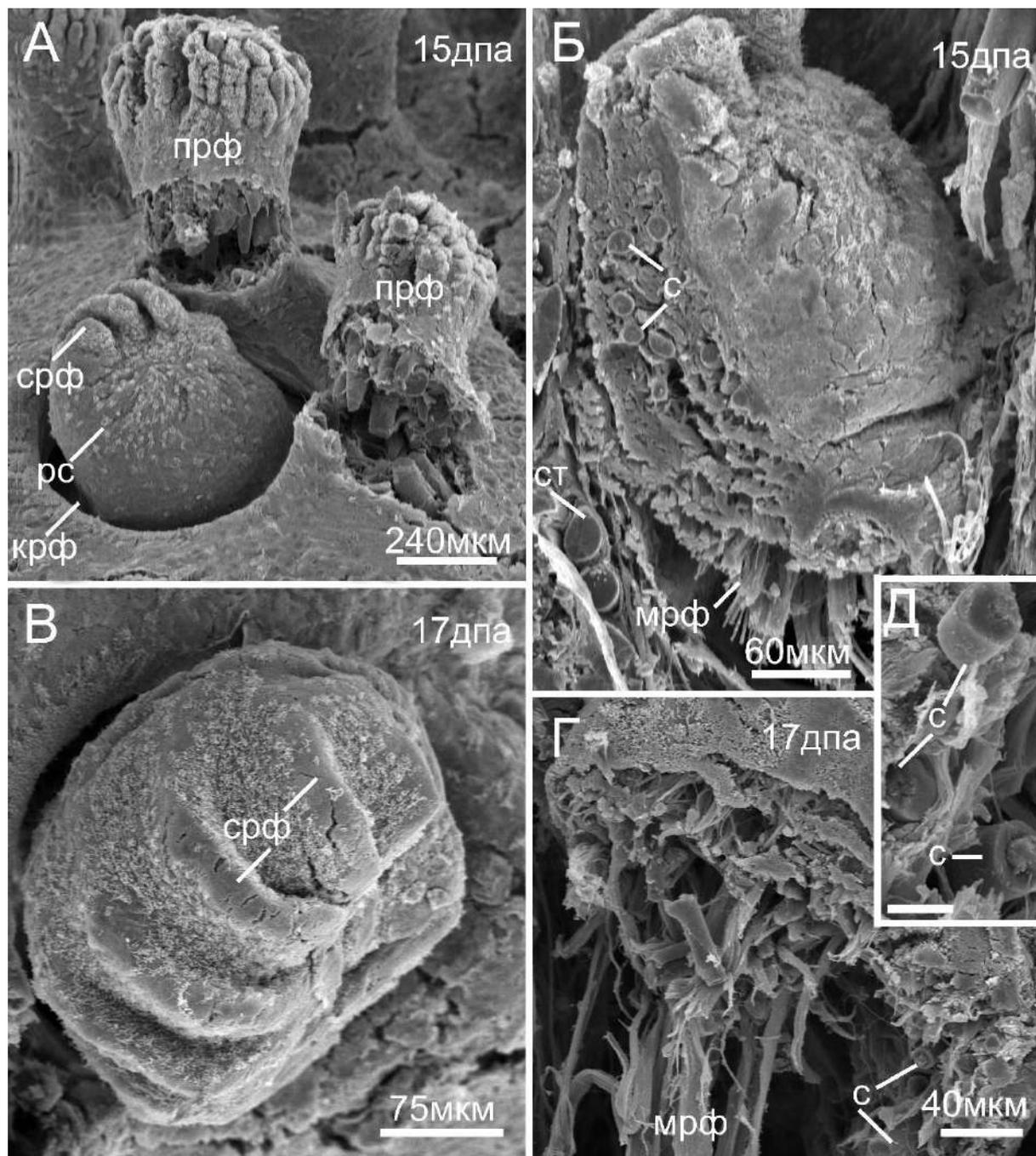


Рисунок 3.63. Морфология регенерирующего ринофора (СЭМ). А–Б – 15 дней после ампутации (дпа); В–Д. 17 дпа. А – внешний вид ринофора с тремя складками; Б – слом ринофора со спикулами; В – внешний вид ринофора с 5 симметричными складками по передней стороне ринофора; Г – слом базальной части регенерирующего ринофора с мышцами–ретракторами и спикулами ринофора; Д – спикулы на сломе с монолитной и неоднородной внутренней структурой. Обозначения: крф – карман ринофора; мрф – мышцы ретракторы ринофора; прф – папиллы ринофора; рс – реснички; с – спикулы; срф – складки ринофора.

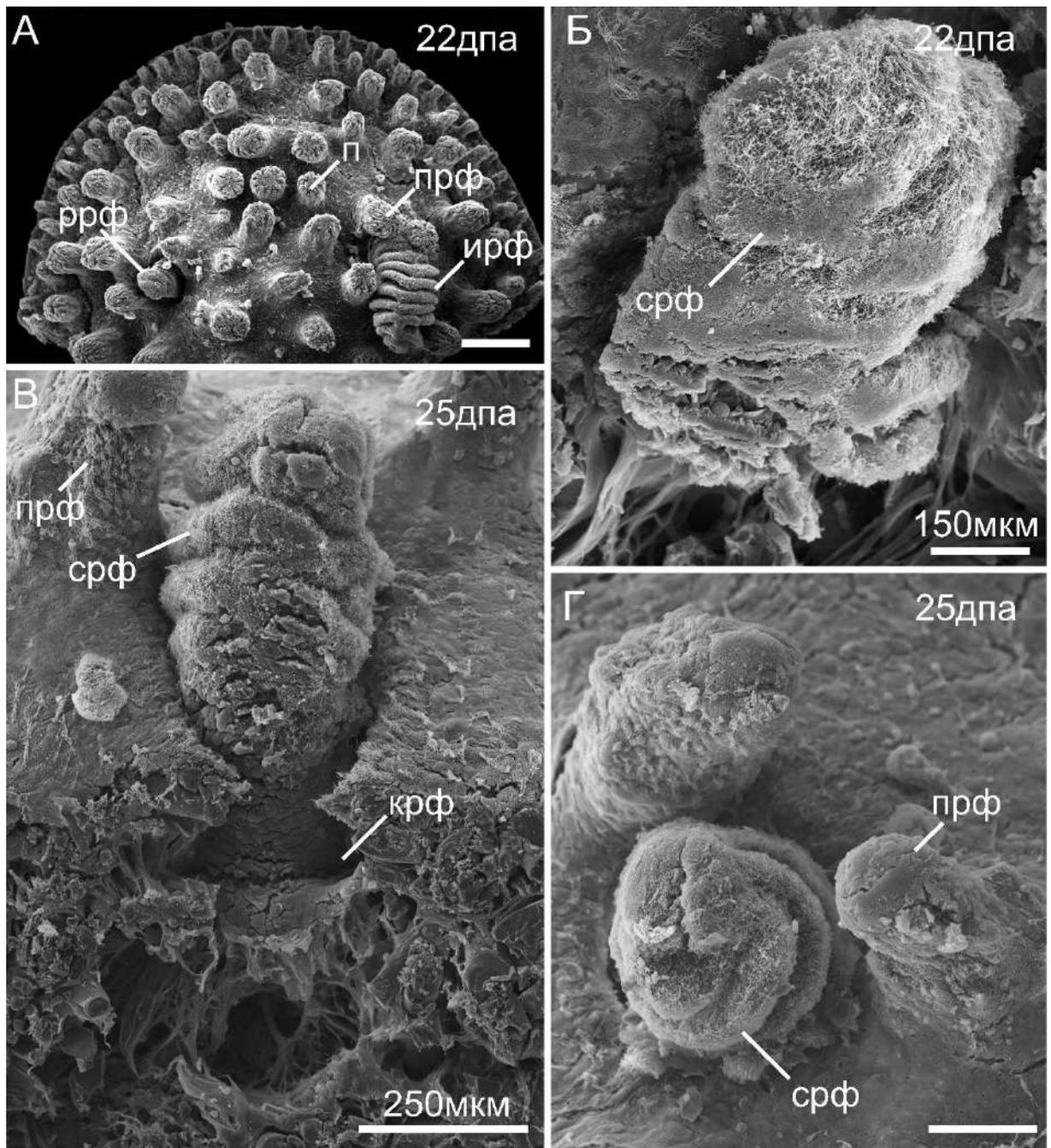


Рисунок 3.64. Внешняя морфология регенерирующего ринофора (СЭМ). А–Б – 22 дня после ампутации (дпа); В–Г – 25 дней после ампутации. А – вид с дорсальной стороны на переднюю часть нотума с ринофорами; Б – вид сбоку на регенерирующий ринофор; В – вид сзади; Г – вид с дорсальной стороны. Обозначения: ирф – интактный ринофор; крф – карман ринофора; п – папилла; прф – папиллы ринофора; ррф – регенерирующий ринофор; срф – складка ринофора. Масштаб: А – 400 мкм; Г – 300 мкм.

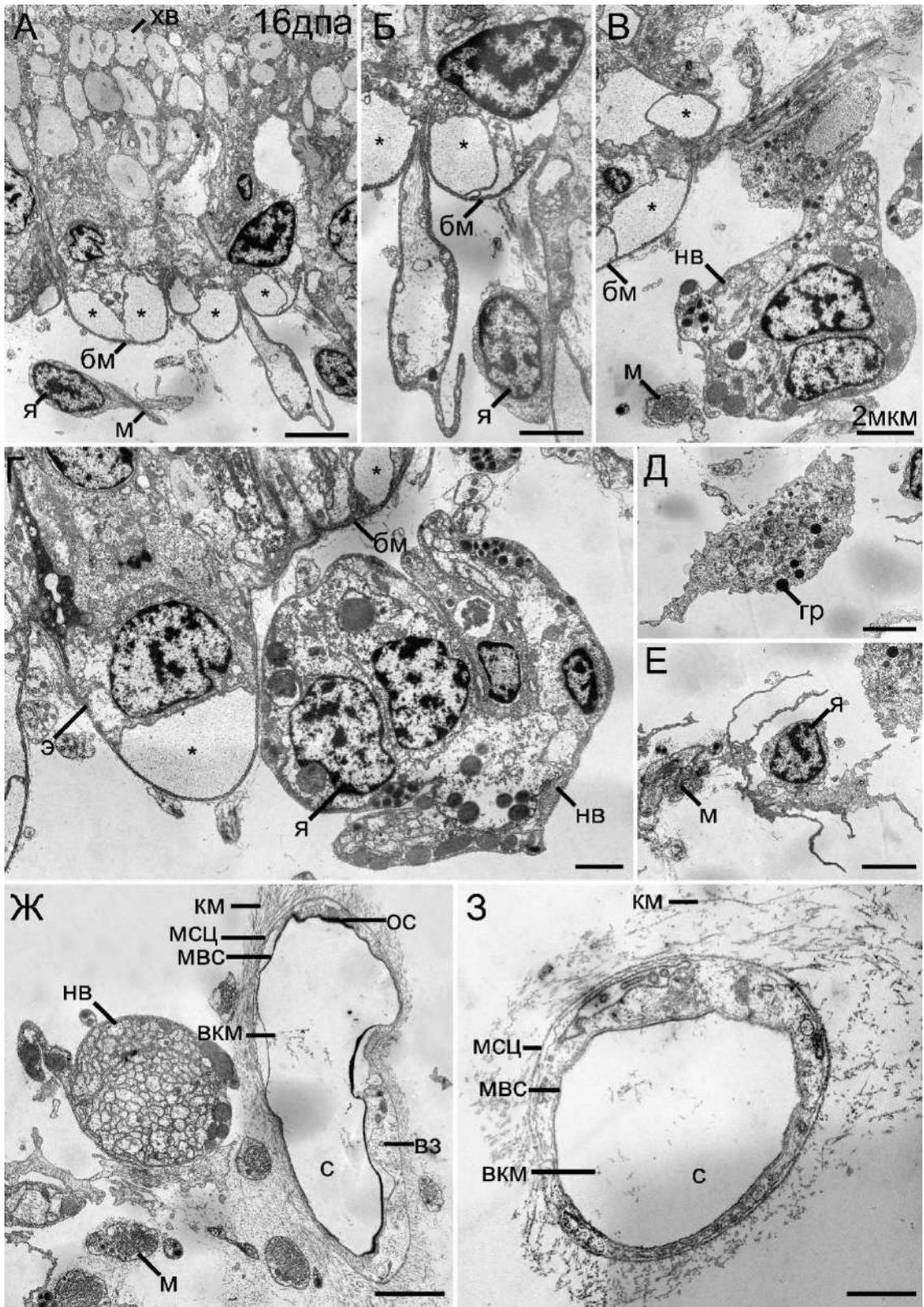


Рисунок 3.65. Особенности ультраструктурного строения эпителия и Икс клеток регенерирующего ринофора *Onchidoris muricata* на 16 день после ампутации (ТЭМ). А – фрагмент эпителия регенерата с Икс клетками (обозначены звездочкой); Б – выпячивание Икс клетки в субэпидермальное пространство; В, Г – нерв; Д, Е – клеточные элементы с гранулами и выростами; Ж, З – склероциты. Обозначения: бм – базальная мембрана; в3 – везикулы; гр – гранулы; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мвс – мембрана вакуоли склероцита; мсц – мембрана склероцита; нв – нерв; ос – осмиофильный слой; с – спикула; хв – хитиновые веретена; э – эпителий; я – ядро.

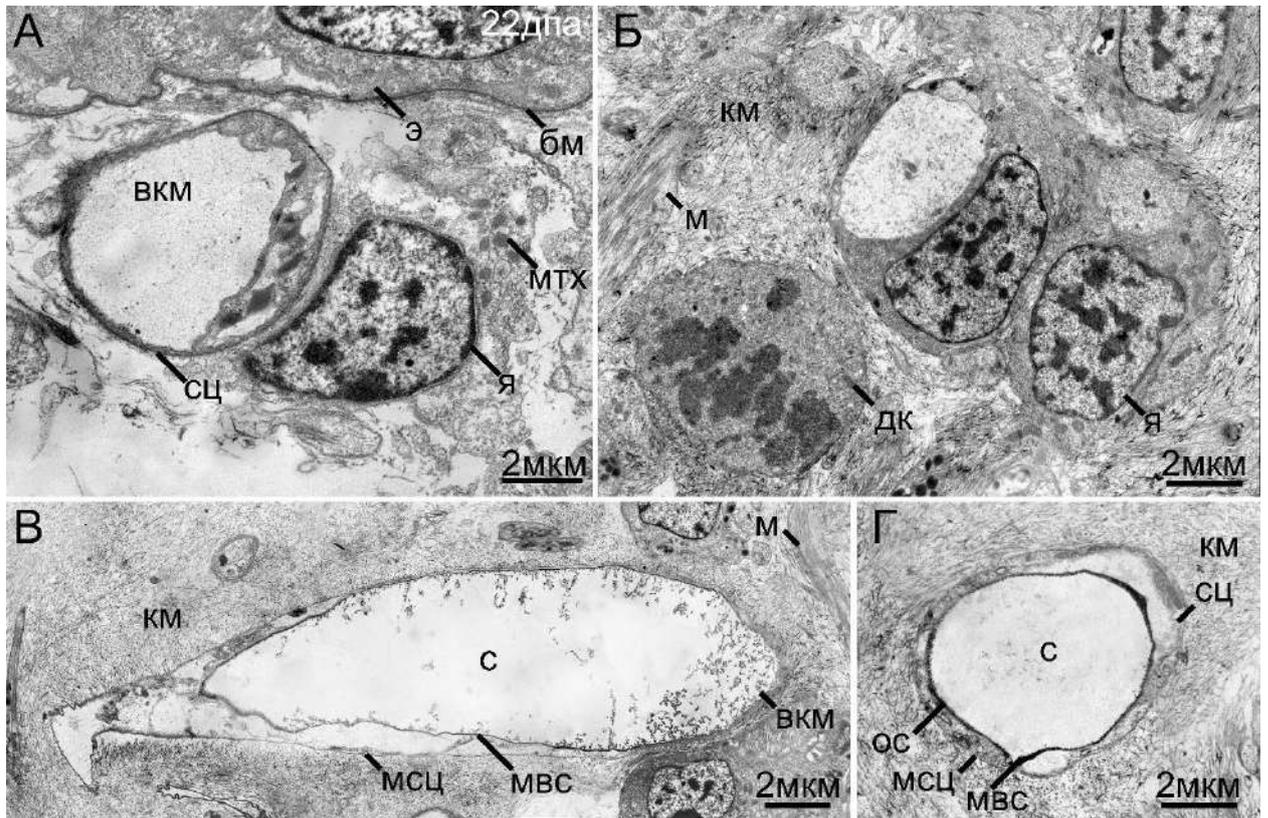


Рисунок 3.66. Особенности ультратонкого строения склероцитов регенерирующего ринофора *Onchidoris muricata* на 22 день после ампутации (ТЭМ). А, Б – склероциты с гомогенным содержимым вакуоли, подобным вакуоли Икс клеток в эпителии; В – склероцит с внутриклеточным матриксом; Г – склероцит с осмиофильной обкладкой вакуоли. Обозначения: бм – базальная мембрана; вкм – внутриклеточный матрикс; дк – делящаяся клетка; км – коллагеновый матрикс; м – мышцы; мвс – мембрана вакуоли склероцита; мсц – мембрана склероцита; мтх – митохондрии; ос – осмиофильный слой; с – спикула; сц – склероцит; э – эпителий; я – ядро.

8.2.3 Иллюстративный материал к главе «Обсуждение»

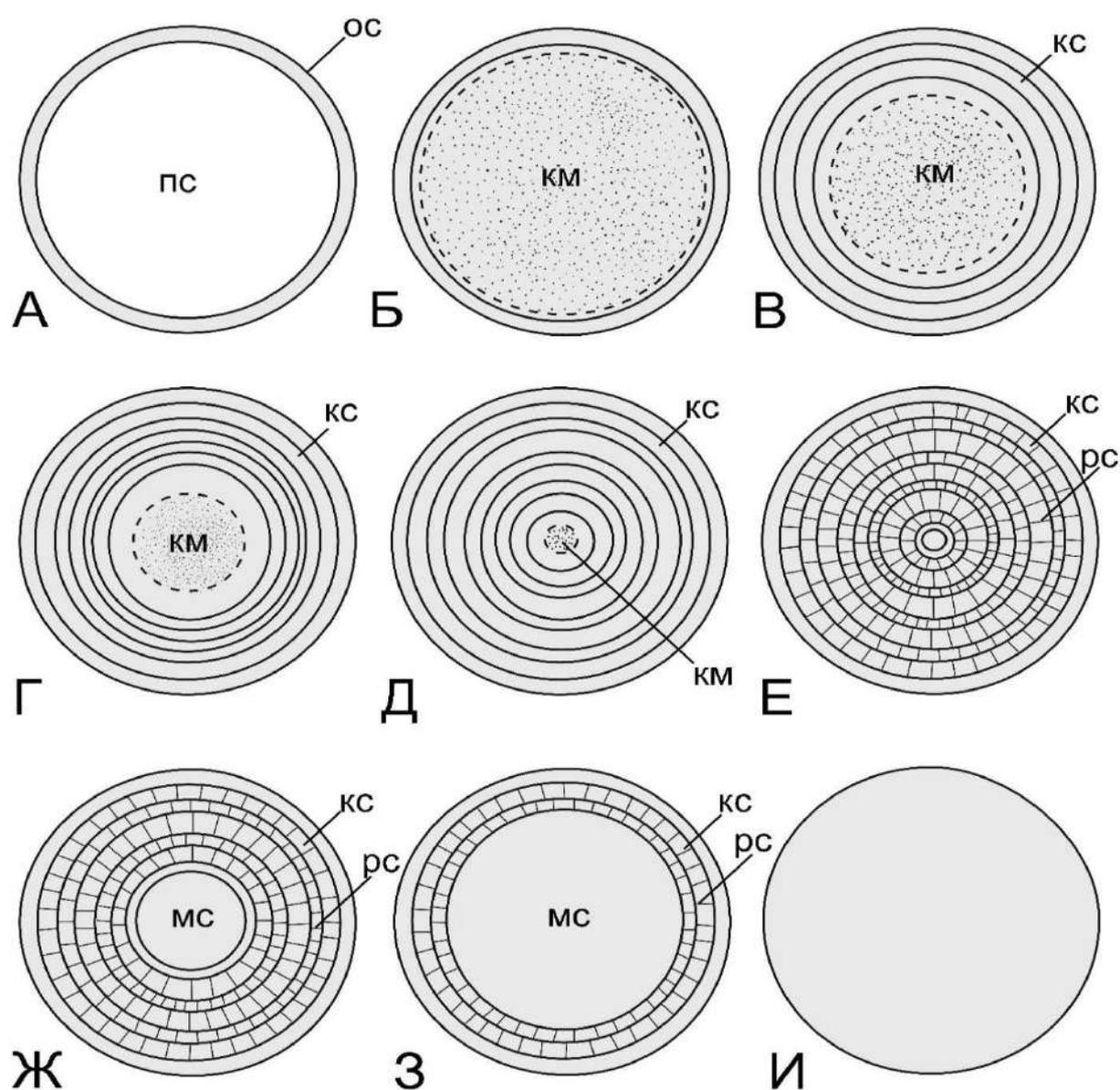


Рисунок 4.1. Схема последовательных стадий развития внутренней структуры спикул. А – полые спикулы первой размерной группы; Б – губчатое внутреннее строение спикул первой размерной группы; внутриклеточный коллагеновый матрикс развивается в просвете спикул первой размерной группы; В – Д – концентрическая внутренняя структура спикул; концентрические слои замещают коллагеновый матрикс; Е – смешанная внутренняя структура, включающая концентрическую и радиальную структуру; появление радиальной структуры в концентрических слоях; Ж – З – смешанная внутренняя структура спикул, включающая монолитную структуру в центре спикул, концентрическую и радиальную структуру в периферической части; развитие монолитного слоя в центре спикул; И – полностью монолитная внутренняя структура (встречается во второй и третьей размерных группах). Обозначения: км – коллагеновый матрикс; кс – концентрические слои; мс – монолитная структура; ос – оболочка спикулы; пс – просвет спикулы; рс – радиальная структура.

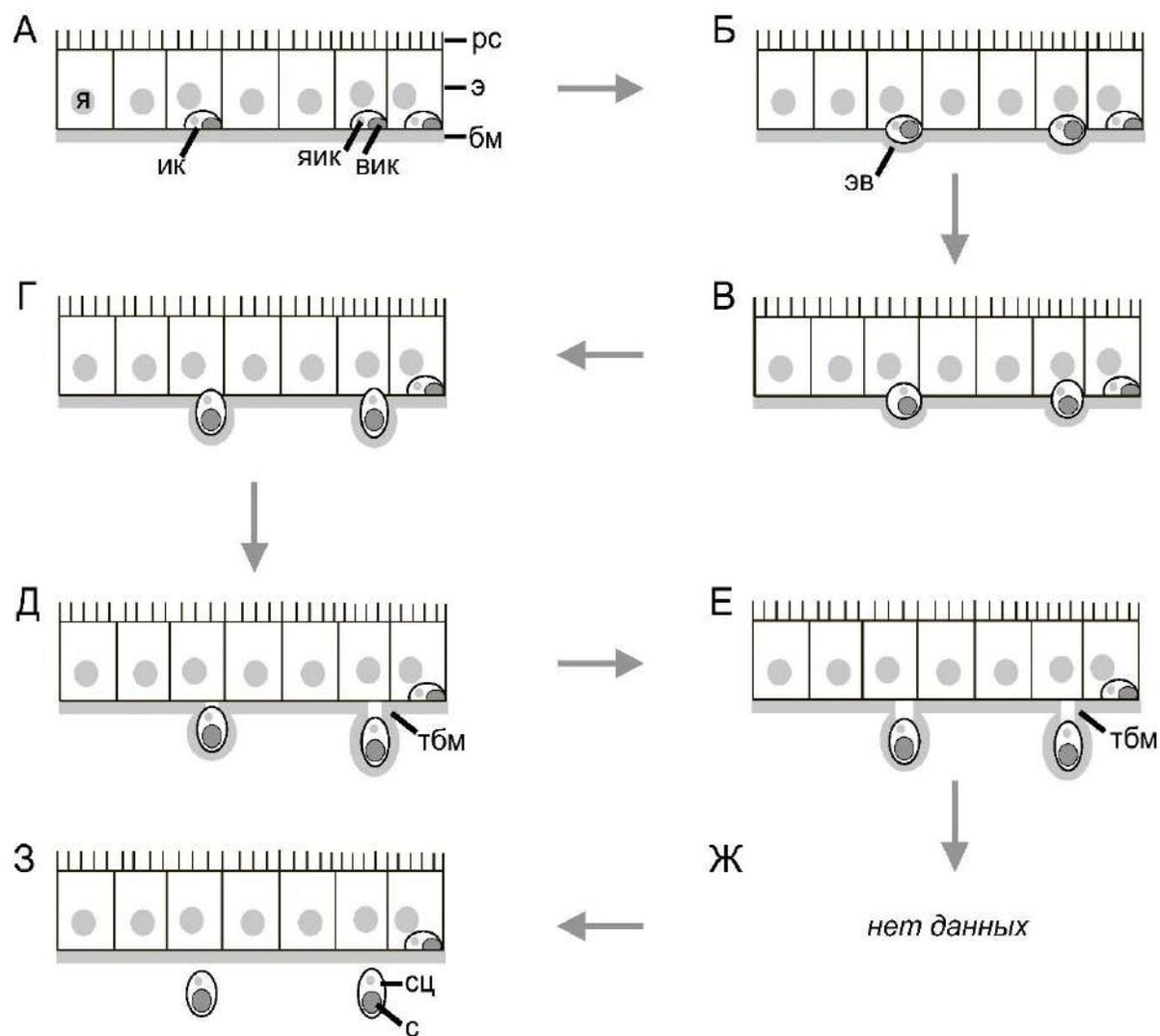


Рисунок 4.2. Гипотеза формирования склероцита в онтогенезе *Onchidoris muricata*. А – инициация Икс клеток в эпителии ранних ювенилей; Б – увеличение размеров вакуоли Икс клеток с мелкозернистым содержимым, начало формирования выпячивания в субэпидермальное пространство; В, Г – продолжение формирования эвагинации в субэпидермальное пространство; Д, Е – формирование мембранных тяжей, погружение Икс клеток в субэпидермальное пространство; Ж – достоверно способ миграции Икс клеток в субэпидермальное пространство не известен, предложена гипотеза формирования перетяжки мембраны и отделения Икс клеток; З – Икс клетки трансформируются в типичный склероцит, в котором развивается и минерализуется спикула в субэпидермальном пространстве. Обозначения: бм – базальная мембрана; вик – вакуоль Икс клетки; ик – Икс клетка; рс – реснички; с – спикула; сц – склероцит; тбм – тяж базальной мембраны; э – эпителий; яик – ядро Икс клетки; я – ядро.

8.3 Протоколы

8.3.1 Протоколы для микроскопических исследований

Протоколы приготовления растворов

Изотоничный раствор хлорида магния 6-водного: для расслабления животных Белого моря с соленостью воды 26 ‰ использовали рабочий раствор, состоящий из 1 части фильтрованной морской воды и 1 части стокового 6-ти водного хлорида магния ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) из расчета 5,08 г на 100 мл дистиллированной воды.

2,5% раствор глутарового альдегид: для фиксации использовался коммерческий 25% глутаровый альдегид (Ted Pella, США), который разбавлялся буфером до финальной концентрации 2,5%. Хранение в холодильнике при 4°C.

Фосфатный буфер (PBS): для приготовления 0,1М PBS использовались коммерческие таблетки буфера (Fluka, Германия). 1 таблетка растворялась в 100 мл дистиллированной воды. Для увеличения срока хранения в некоторых случаях добавляли азид натрия (NaN_3 , ПанЭко, Россия) на кончике ножа.

Модифицированный какодилатный буфер:

на 100 мл

- 2.14 г Na -cacodylate trihydrate;
- 0.5 г NaCl;
- 0.06 г $CaCl_2$;
- 0.1 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

1% раствор тетроксид осмия (OsO_4): для приготовления использовался коммерческий 4% OsO_4 (Ted Pella, США). Перед использованием аликвоты стокового раствора размораживались при комнатной температуре в темноте. Затем разбавляли до 1% концентрации буфером.

5% раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты ЭДТА: 5 г сухой ЭДТА довели до объема 50 мл дистиллированной водой. Постоянно перемешивали магнитной мешалкой и по каплям добавляли 10 М NaOH. до полного растворения ЭДТА, рН довели до 7,5–8,0 с помощью 1 М и 0,1 М NaOH, далее довели объем до 100 мл дистиллированной воды.

16% раствор параформальдегида (ПФА): для приготовления 16% ПФА использовали сухой параформальдегид (Sigma), который разводили 10xPBS, рН=7,5 довели 10М NaOH.

Подложка для бленд: для изготовления бленд использовали коммерческий раствор 1% формвара (поливинилформаль) на дихлорэтаноле (кат. #15830, EMS, США). Либо готовили 1% раствор формвара на диоксане. Для получения подложки предварительно очищенное и высушенное предметное стекло погружали вертикально на несколько секунд в раствор формвара. При медленном извлечении стекла из емкости его выдерживали в парах растворителя над раствором до тех пор, пока она не казалась сухой. Окончательное высушивание проводили на воздухе. Затем лезвием бритвы срезали толстый край пленки на нижнем и боковых краях стекла. Затем стекло медленно погружали в емкость с дистиллированной водой для отделения пленки. После на свободную пленку выкладывали медные бленды (Ted Pella, США). Для извлечения пленку с блендами накрывали куском парафильма и вытаскивали из воды. Далее бленды на парафильме полностью высушивали в приоткрытой чашке Петри под лампой. Затем отделяли каждую бленду с подложкой от парафильма с помощью препаровальных игл.

Блокирующий раствор для иммуногистохимической проводки:

- 1% BSA (Sigma-Aldrich, США);
- 0,1% cold-water fish skin gelatin (Sigma-Aldrich, США);
- 1% Triton X-100 (Ferak Berlin, Германия);
- 0,05% Tween 20 (Ferak Berlin, Германия);
- 0.1M PBS ()

8.3.2 Протоколы фиксаций

Фиксация глутаровым альдегидом (ГА) для СЭМ и микроКТ

- Расслабление особей в 4% MgCl₂ в течении 4-24 часов при 4°C (в зависимости от размера особи);
- фиксация 2,5% ГА на 0,1 М PBS (или РВ Millonig's, или Модифицированный какодилатный буфер) 1 час при комнатной температуре (RT) на качалке 120 rpm;
- Смена раствора 2,5 % ГА, продолжение фиксации в течение еще 1 ч (RT, 120rpm);
- Отмывка соответствующим буфером 3 раза по 30 мин (RT, 120rpm);
- Проводка по этиловому спирту (EtOH) восходящей концентрации (RT, 120rpm):
 - 10° EtOH 3 раза по 15 минут;
 - 30° EtOH 3 раза по 15 минут;
 - 50° EtOH 3 раза по 15 минут;
 - 70° EtOH 3 раза по 15 минут;
 - 96° EtOH 3 раза по 15 минут
- 6) Дегидратация объекта в смеси спирт, ацетон (Ac) (RT, 120rpm):
 - 96° EtOH: Ac (3:1) 2 раза по 20мин;
 - 96° EtOH: Ac (1:1) 2 раза по 20 мин;
 - 96° EtOH: Ac (1:3) 2 раза по 20мин;
 - Ac чистый 1 смена через 20 мин;
- 7) высушивание объекта в критической точке.

Фиксации для изучения на трансмиссионном электронном микроскопе (ТЭМ)

- Расслабление объектов в 4% MgCl₂ *6H₂O в течение 4-24 часов при 4°C (в зависимости от размера особи);
- фиксация 2,5% ГА на 0,1 М PBS (или РВMillonig's, или Модифицированный какодилатный буфер) на 1 час (RT, 120rpm);
- смена раствора ГА на аналогичный, фиксация еще 1 час (RT, 120rpm);
- отмывка соответствующим буфером 3 раза по 30 мин (RT, 120rpm);
- осмирование 1% OsO₄ в течение 1-4 часов в темноте до почернения (RT);
- отмывка соответствующим буфером 3 раза по 30 мин (RT, 120rpm);
- декальцинация в 5% растворе ЭДТА с рН= 7,5–8,0 1 ч (RT, 120rpm);
- отмывка в дистиллированной воде 3 раза по 20 мин (RT, 120rpm)
- проводка по этиловому спирту восходящей концентрации (RT, 120rpm):
 - 10° EtOH 3 раза по 15 минут;
 - 30° EtOH 3 раза по 15 минут;
 - 50° EtOH 3 раза по 15 минут;

- 70° EtOH 3 раза по 15 минут;
- 96° EtOH: Ас (1:3) 2 раза по 20мин;
- Ас чистый 1 смена через 20 мин;
- пропитка смолой Spurr или Epon (Ted Pella, США) через смеси смолы и ацетона
 - ацетон:смола (3:1) (24 часа, RT, 120rpm);
 - ацетон:смола (1:1) (24 часа, RT, 120rpm);
 - ацетон:смола (1:3) (24 часа, RT, 120rpm);
 - чистая смола (24 часа, RT, 120rpm);

Объект в чистой смоле перемещали на заранее полимеризованные подложки смолы;

- Далее полимеризовали в термостате с температурой 37°C минимум на 24 ч;
- После чего продолжали полимеризацию смолы в термостате при 60°C (минимум 24 ч).

Контрастирование бленд:

- в чашку Петри диаметром 2,5 см помещали кусок парафильма, на который капали дистиллированную воду и раствор уранил ацетата;
- бленду помещали срезом вниз на каплю уранил ацетата;
- перемещали чашку в термостат с температурой 37°C на 45 мин;
- далее проводили отмывку от уранил ацетата в трех сменах дистиллированной воды;
- в новую чашку Петри с парафильмом клали гранулированный гидроксид натрия (NaOH) и закрывали крышкой;
- приоткрыв крышку, капали цитрат свинца, на каплю которого помещали бленду;
- инкубировали 10 мин при комнатной температуре в темноту;
- отмывали от цитрата свинца в трех сменах дистиллированной воды;
- отмывтые бленды сушили под лампой накаливания.

Фиксация параформальдегидом (ПФА) для изучения на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (КЛСМ):

- после расслабления моллюсков 4% MgCl₂ *6H₂O осуществляли препарирование частей тела;
- затем объекты помещали в 4% раствор ПФА на 0.1М фосфатном буфере (PBS) на 4 часа (RT, 120rpm) или на ночь (4°C, 120rpm);
- после отмывали 0.1М фосфатным буфером (PBS) (3x10 мин).

Проводка для окрашивания флуоресцентными красителями и антителами:

- после фиксации объектов ПФА и отмывки от фиксатора, объекты помещали в раствор 0,1М фосфатного буфера (PBS) с добавлением тритона (итоговое содержание 1%) на ночь (4°C, 120rpm);
- затем буфер сменяли на блокирующий раствор (2x8 часов, 4°C, 120rpm);
- далее блокирующий раствор сменялся на флуоресцентные красители для детектирования:
 - актиновых филаментов Phalloidin fluorescein (FITC, F432, SigmaAldrich), Phalloidin (TRITC, P1951, Sigma-Aldrich) (разведение 1:1000; 8 часов, 4°C, 120rpm);
 - ядер Propidium Iodide solution (PI, 5 мкг/мл на PBS, Sigma) или DAPI (10 мкг/мл на PBS, Sigma) (8 часов, 4°C, 120rpm);
 - не полимеризованных полисахаридов, в т.ч. хитина Calco-fluor White (Fluorescent Brightner 28, кат. # F3543, Sigma) (1 час, 4°C, 120rpm);

- для детектирования зон связывания кальция calcein disodium salt (1 мкг/мл на фильтрованной морской воде; Honeywell Fulka, Santa Cruz Biotechnology) (время инкубации зависело от эксперимента);
- от красителя отмывали фосфатным буфером (3x20мин, RT, 120rpm);
- для детектирования элементов нервной системы, коллагена была использована иммуногистохимическая окраска. Применяли первичные антитела для детектирования:
 - элементов нервной системы (FMRF-amide, разведение 1:500; Anti-serotonin, разведение 1:1000; α - тубулин – разведение 1:1000; Sigma-Aldrich, США);
 - коллагена (Anti-collagen IV, разведение 1:100, кат. # PA1-28534, ThermoFisher).
- Инкубация в первичных антителах проводилась в течении 1-2 суток (4°C, 120rpm);
- затем объекты отмывались от первичных антител блокирующим раствором (3x20мин, RT, 120rpm);
- после объекты инкубировали во вторичных антителах конъюгированными с флуоресцентной меткой в течении суток (Donkey Anti-mouse IgG AlexaFluor488(0.5мг/мл, кат # A-21202, Invitrogen); Donkey Anti-rabbit IgG AlexaFluor647, 0.5мг/мл, кат # A-31571, Invitrogen) (4°C, 120rpm);
- отмывку от антител осуществляли 0,1М фосфатным буфером (3x20мин, RT, 120rpm);
- при необходимости после иммуногистохимической окраски осуществляли окраску флуоресцентными красителями, как описано выше.

Просветление объектов и приготовление препаратов. Для приготовления препаратов объекты были просветлены двумя способами:

Просветление с помощью глицерина (RT):

- после отмывки фосфатный буфер замещался 10% раствором глицерина на 20 мин;
- затем раствор глицерина сменялся на раствор большей концентрации (30, 50, 70) 20-60мин в каждой смене;
- после объект помещался на покровное стекло в каплю 90% глицерина и покрывался также покровным стеклом.

Просветление с помощью изопропилового спирта и Murray's Clear (бензилбензоата) (RT):

- просветление объектов проводили на предметной стекле с лункой под бинокляром;
- после отмывки фосфатный буфер замещался изопропиловыми спиртами восходящих концентраций (70, 85, 95, 100) по 40 сек в каждой стадии;
- после объект помещался в смесь изопропилового спирта и раствора Murray Clear (2 части бензилбензоата и 1 часть бензилового спирта) (40 сек);
- после объект был заключен между двумя покровными стеклами в чистом Murray Clear.

8.3.3 Протоколы для проведения молекулярных исследований

Протоколы приготовления растворов

Среда Луриа-Бертани (LB):

- 25 г сухой среды LB (Servicebio, Китай) разводили на 1 л дистиллированной воды;

- среда LB с ампициллином: в холодную автоклавированную среду LB добавляли ампициллин (50 мкг/мл);
- агаризованная среда LB: перед автоклавированием в среду LB дополнительно добавляли бактериальный агар до концентрации 1.5%.

Буферы и растворы для гибридизации *in situ*

Все буферы и растворы для гибридизации *in situ* готовили на воде высокой степени очистки (miliQ)

P_{TW}

- 1M PBS;
- 100 мкл 0.1% Tween;
- 99,9 мл деионизированной воды.

20xSSC pH=7.0 и pH=4.5:

- 8,823г 0.3M цитрат натрия;
 - 17,55г 3M хлорид натрия.
- Буферы доводили до pH=4.5 и pH=7 с помощью концентрированных HCL и 10N NaOH.

Буфер малеиновой кислоты (MAB pH=7.5) на 100 мл:

- 1,74 г малеиновой кислоты;
 - 0,585г хлорида натрия;
 - деионизированная вода.
- Буфер доводили до pH=7.5 10N NaOH.

4% PFA на P_{TW}. 4% раствор PFA на P_{TW} из стокового 16% раствора. Раствор доводили до pH=7.2-7.4 с помощью концентрированного HCL и 10N NaOH.

1%TEA. 1 г триэтанолamina гидрохлорида на 100 мл P_{TW}.

Блокирующий раствор. 1г Roshe Blocking reagent на 100 мл MAB, растворяли при +58°C периодически помешивая.

Гепарин. 10 мг гепарина на 1 мл деионизированной воды, аликвотировали и хранили на -20°C.

Глицин. 4 мг Глицина на 1 мл P_{TW}, готовили непосредственно перед использованием.

Гибридизационный буфер:

- 30 мл формамида;
- 15 мл 20xSSC (pH=4.5);
- 300 мкл гепарина (10мг/мл);
- 60 мкл Tween 20;
- 6 мл 10% SDS;
- 300 мг Torula RNA;
- 8,64 мл деионизированной воды.

Буфер щелочной фосфатазы (AP-буфер):

- AP-буфер без Mg²⁺: готовили непосредственно перед использованием

- 2 мл 5M NaCl;
 - 10 мл 1M Tris (pH=9.5);
 - 0.1 мл Tween20;
 - 88 мл H₂O.
- AP-буфер (полный): готовили непосредственно перед использованием;
 - 2 мл 5M NaCl;
 - 5 мл 1M MgCl₂;
 - 10 мл 1M Tris (pH=9.5);
 - 0.1 мл Tween20;
 - 83 мл H₂O.

Протокол выделения РНК

1 этап. Гомогенизация.

- В пробирку объемом 1,5 мл с объектами исследования (до 10 особей *O. muricata*) добавляли 0.5 мл Extract RNA (Евроген, Россия), быстро гомогенизировали пестиком;
- после завершения процесса гомогенизации добавляли в пробирку еще 0.5 мл Extract RNA.

2 этап. Лизис.

- Лизат инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут, чтобы произошла полная диссоциация нуклеопротеидных комплексов. Лизат периодически помешивали путем переворачивания пробирки;
- центрифугировали полученный лизат в течение 10 минут при 4°C 12000 об/мин;
- супернатант переносили в новую пробирку, не касаясь осадка и липидного слоя на поверхности.

3 этап. Разделение фаз.

- К супернатанту добавляли 0.2 мл хлороформа;
- инкубировали 15 минут при комнатной температуре, периодически (примерно раз в 2 минуты) активно встряхивая до образования характерной эмульсии;
- центрифугировали пробирку в течение 20 минут при 4°C в холодной центрифуге при максимальных оборотах (12000 об/мин);
- аккуратно, не касаясь интерфазы отбирали водную фазу с РНК в чистую пробирку.

4 этап. Выделение РНК.

- В пробирку с водной фазой добавляли 0,5 мл изопропанола;
- вортексировали пробирку;
- инкубировали 10 мин при комнатной температуре;
- центрифугировали пробирку 15 мин при комнатной температуре на максимальных оборотах (14тыс.об/мин в центрифуге MiniSpin);
- супернатант удаляли, сохраняли осадок (РНК) на дне пробирки;
- в пробирку добавляли 1 мл этилового спирта 75%;
- центрифугировали пробирку 10 мин при комнатной температуре на максимальных оборотах (14тыс. оборотах в центрифуге MiniSpin);
- вновь удаляли супернатант;

- дважды повторяли отмывку этиловым спиртом;
- после удаления супернатанта высушивали содержимое в открытой пробирке в течении 2-5 мин при комнатной температуре.

Далее сразу очищали выделенную РНК коммерческим набором CleanRNA Standard (Евроген, Россия) по протоколу производителя. РНК растворяли в 30 мкл воды свободной от нуклеаз.

8.3.4 Протокол синтеза зондов для *in situ* гибридизации

Протокол амплификации дц-кДНК. Препаративная наработка дц-кДНК

- На основе полученной РНК синтезировали первую цепь кДНК коммерческим набором Mint (Евроген, Россия) по протоколу производителя.)
- Для каждого образца первой цепи кДНК подготавливали реакционную смесь:
 - 40 мкл деионизированной воды свободной от нуклеаз;
 - 5 мкл 10X Encyclo buffer;
 - 1 мкл dNTP mix (10 mM каждого);
 - 2 мкл PCR M1 Primer (10 μM);
 - 1 мкл 50X Encyclo polymerase mix;
- реакционную смесь перемешивали;
- в пробирки для ПЦР помещали по 49 мкл смеси;
- затем вносили по 1 мкл первой цепи кДНК;
- содержимое перемешивали;
- амплифицировали по схеме:
 - предварительная денатурация 1 цикл 95 °C 1 мин, 95 °C 15 сек;
 - циклы ПЦР 21 цикл 66 °C 20 сек, 72 °C 3 мин;
- финальная элонгация 1 цикл 66 °C 20 сек, 72 °C 3 мин;
- по окончании амплификации проводили анализ продуктов ПЦР с помощью гель-электрофореза.

Протокол получения целевого фрагмента исследуемого гена:

- специфичные праймеры (см. ниже) разводили до финальной концентрации 10 mM; Primer mix – из расчета на 50 мкл;
 - 40 мкл деионизированной воды свободной от нуклеаз;
 - 5 мкл dir праймер;
 - 5 мкл rev праймер;
- реакционная смесь для ПЦР состояла из:
 - 40 мкл деионизированной воды свободной от нуклеаз;
 - 5 мкл 10X Encyclo buffer;
 - 1 мкл 50x dNTP mix;
 - 2 мкл Primer mix (10 μM);
 - 1 мкл дц-кДНК;
 - 1 мкл 50X Encyclo polymerase mix;
- амплифицировали с учетом времени элонгации 60 с на 1000 пар нуклеотидов по схеме:
 - предварительная денатурация 1 цикл 95 °C 1 мин, 95 °C 15 сек;
 - x35 циклов ПЦР. Температура отжига праймеров 30 сек, 72°C;

- финальная элонгация 1 цикл 72°C 3 мин.

Протокол очистки продукта амплификации:

- к раствору РНК добавляли 0,1 объем 3М ацетата натрия, вортексировали;
- добавляли 1 объем изопропанола, вортексировали;
- пробирку центрифугировали (20 мин, 12тыс. об/мин, 4°C), после чего удаляли жидкость;
- к осадку добавляли 200 мкл 75% этилового спирта;
- пробирку центрифугировали (10 мин, 12тыс. об/мин, RT);
- промывку этиловым спиртом повторяли еще два раза;
- после удаления жидкости высушивали осадок на воздухе, избегая пересушивания;
- растворяли РНК в 10-20 мкл деионизированной воды, свободной от нуклеаз.

Протокол трансформации компетентных клеток:

- к 100 мкл компетентных клеток XL1-Blue *E. coli* (Евроген, Россия) добавляли 10 мкл лигазной смеси и 1 мкл меркаптоэтанол, сразу перемешивали;
- инкубировали пробирку 30 мин на льду;
- пробирку быстро перемещали в водяную баню, разогретую до 42°C на поплавок на 1,5 мин (Реакция теплового шока);
- затем быстро перемещали пробирку в лед;
- дальнейшие манипуляции с клетками выполняли под ламинаром (RT);
- в пробирку добавляли 900 мкл теплой среды LB без антибиотика, аккуратно перемешивали переворачиванием;
- пробирку помещали горизонтально в термостат с температурой 37°C на 1 час;
- заранее заливали чашки Петри средой LB-агаром с ампициллином (100 мкг/мл);
- пробирку центрифугировали при максимальной оборотах 1 мин;
- из пробирки удаляли 900 мкл жидкости;
- аккуратно пипетировали содержимое пробирки, не вспенивая;
- клетки *E. coli* перемещали в центр чашки Петри;
- аккуратно распределяли клетки микробиологическим шпателем по всей поверхности чашки;
- открытые чашки Петри подсушивали рядом с пламенем горелки в течении 5-10 мин;
- инкубировали чашки вверх дном в термостате при +37°C 18-20 часов до появления видимых колоний *E. coli*.

Протокол ПЦР скрининга колоний:

- ПЦР смесь содержала:
 - 210 мкл Стерильной воды;
 - 25 мкл 10X Буфера для ПЦР (Encyclo PCR buffer);
 - 5 мкл 50X Смесь dNTP (10 mM каждой);
 - 5 мкл Смесь праймеров для отбора рекомбинантных клонов (10 мкМ каждого M13dir и M13rev);
 - 5 мкл Taq полимеразы;
- амплификацию осуществляли, используя следующую программу:
 - Предварительная денатурация 95°C 5 мин;
 - Циклы ПЦР 26 циклов: 95°C 15 сек, 60°C 15 сек; 72°C 15 сек;
- анализ продуктов ПЦР проводили методом гель-электрофореза.

Протокол синтеза анти-смысловых РНК зондов:

- транскрипцию *in vitro* проводили в смеси, содержащей:
 - 5 мкл 5х буфера для транскрипции;
 - мкл DTT (100 мкМ);
 - 0.5 мкл ингибитора РНКаз RiboLock (40U/мкл);
 - мкл 10х DIG RNA Labeling Mix;
 - 500 нг ДНК;
 - 2 мкл на 25 мкл смеси РНК-полимеразы (Sp6 или T7, согласно направлению вставки, 200U/мкл);
- после аккуратного перемешивания смесь инкубировали 7 часов при +37°C;
- затем добавляли 1 мкл ДНКазы RQ1 RNase-free DNase (1U/мкл);
- инкубировали смесь 45 мин при 37°C.

Протокол гибридизации in situ:

Протокол фиксации материала для гибридизации in situ:

- особей *Onchidoris muricata* расслабляли в течении 1 ч в растворе MgCl₂*6H₂O;
- затем перемещали в свежий 4% раствор PFA на PBS на 2 часа (120rpm);
- фиксатор отмывали 5 сменами PBS по 5 мин в каждой;
- буфер сменяли холодным метанолом;
- спустя 5 мин меняли метанол на свежий;
- пробирки перемещали в -20°C минимум на ночь;

Объекты делили на 3 группы: положительный контроль, отрицательный контроль, экспериментальную группу

1 этап. Регидратация и пермеабилзация.

Образцы *регидратировали* поэтапно:

- метанол : РТw (смесь 60:40) 5 мин;
- метанол : РТw (смесь 30:70) 5 мин;
- РТw 100% 3 × 5 минут.

Пермеабилзация:

- протеиназу К разводили РТw до концентрации 20 мг/мкл;
- инкубировали в протеиназе К в течение 1 минуты при комнатной температуре;
- работу протеиназы останавливали, инкубируя в глицине 2 × 5 мин.

2 этап. Блокирование и гибридизация.

- Образцы промывали в 0,1 М триэтаноламине (рН 7–8) 2 × 5 минут;
- затем сменяли раствор на 0,1 М триэтаноламин с уксусным ангидридом (3 мкл уксусного ангидрида на 1 мл 0,1 М триэтанолamina) 5 минут;
- 0,1 М триэтанолamiном с уксусным ангидридом (6 мкл уксусного ангидрида на 1 мл 0,1 М триэтанолamina) 5 минут;
- образцы отмывали в РТw 2 × 5 минут;
- дофиксацию проводили 4% параформальдегидом на РТw в течение 1 часа;
- отмывали от фиксатора в РТw 5 × 5 минут;
- затем инкубировали 5 мин в растворе РТw и гибридизационного буфера;
- далее раствор сменяли на чистый гибридизационной буфер, инкубировали 10 мин;

- раствор меняли еще раз, инкубировали ночь в водяной бане при 58°C.

Перед гибридизацией с зондами:

- зонд разводили до концентрации 1нг/мкл на гибридизационном растворе;
- инкубировали 5 мин при 80°C;
- после чего объект гибридизовали с зондами 36 часов при 58°C.

Дальнейшие манипуляции осуществлялись теплыми растворами при 58°C:

- образцы перемещали в пробирку с повторно используемым буфером для гибридизации на 30 мин;
- использованные зонды, разведенные гибридизационным буфером замораживали при минус 20°C для повторного использования;
- гибридизационный раствор сменяли на его смесь с 2х SSC (в соотношении 60:40). Инкубировали 30 мин;
- раствор меняли на смесь гибридизационного буфера с 2х SSC (30:70). Инкубировали 30 мин;
- раствор меняли на 2х SSC 2 раза × 30 минут;
- далее меняли раствор на 0,075х SSCT. Инкубировали 2 раза х20 мин.

3 этап. Выявление сигнала

Все последующие манипуляции осуществлялись при комнатной температуре:

- промывали 2 × 10 минут в МАВ при комнатной температуре;
- инкубировали объекты в 1% блокирующем растворе на МАВ 1 час;
- первичные антитела к дигоксигенину, конъюгированными с щелочной фосфатазой (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, овца; 150U; Roche, кат. #11093274910, Швейцария), разводили в соотношении 1:2000 на блокирующем растворе;
- инкубировали объект 30 мин, затем ночь при 4°C;
- от антител отмывали МАВ 10 раз х 5 мин;
- затем инкубировали в буфере щелочной фосфатазы без магния 5;
- затем инкубировали в полном буфере щелочной фосфатазы 2 раза по 5 мин;
- реагент NBT/BCIP разводили на буфере щелочной фосфатазы 1:1000;
- инкубировали объект в реагенте NBT/BCIP в лунках 12-луночного планшета, защищенных от света алюминиевой фольгой;
- контролировали до тех пор, пока хромогенная реакция не даст синюю окраску;
- затем останавливали хромогенную реакцию, промыв в МАВ;
- МАВ заменяли на дистиллированную воду, затем этиловый спирт.

4 этап. Приготовление препаратов.

- Образцы просветляли глицерином или бензил бензоатом;
- заключали на предметном стекле под покровное стекло.

8.3.5 Праймеры и последовательности гена интереса

В работе были использованы:

Стандартные праймеры:

T7: 5' ТАА ТАС GAC TCA CTA TAG GG 3'

Sp6: 5' АТТ TAG GTG АСА CTA TAG ААТ АС 3'

M13f: 5' CCC AGT CAC GAC GTT GTA AAA CG 3'

M13r: 5' AGC GGA TAA CAA TTT CAC АСА GG 3'

Специфичный праймер гена карбоангидразы для ПЦР:

CA_01-3 dir; ATAGCAGCAGTCAACGGAGG

CA_01-3 rev; AGGCTGGATAGGTCGGAAGT

Последовательность гена карбоангидразы CA01-3:

ATGGTGTTCCTCTTTAGTCATTGCAGCTGTGTGTTGCATAGCAGCAGTCAACGGAGGTGCA
ACAGGCTGGAAC TACGAGCTTGGATCTCCTGAAGGTCCGTCTCATTGGTCGGAGACCTAT
CCCGATTGCGGTGGAGTGATGCAATCTCCCATCGACATCACCTACGCTGTTTCATGACCCC
GAACTGAACTTCTTTGACACCAGCGAGTACAGCATCACTGACGGTGTACGATGACCCTG
CACAACGTCCAAGGACACACAGTCGAGGTGCAGTATGCTGGCACGCCTGTCTTCCTGAAG
GGCGGAAGTCTTCCC CATGAGTACCAAGTGGACCAGTTCCATTTCCATTGGGGATTGAAG
GACTCACGGGGATCTGAACATGCCGTCGACGGCAAGCACTTCCCTATGGAGATGCACATC
GTTTCATCACCTGGCTAGCATGCCAACGGCAGCGCTGCCATGGTACATCCCTATGGCCTG
GCAGTGATGGGATTCTTCATCGAGATCGGAGCACACAACCCAACTTTGATCAGCTGTTG
AAGCATTTCCACTCCATCCAAAACCCAGAAGACCACATTGCCATTCCCTACCATGAAGCTG
GCTGACCTCTTGCCCAAACCAGACAGTGGCAACCTGGACTATTACCGCTACATGGGAAGT
CTGACCACACCTCCGTGTTACGAGACTGTCATCTGGTCTATGAACTACAACGCCATCGTC
ATATCTGAGGCACAGATCGATGTGTTCCGAAGCCTGTTTCGAGGACGGCCACGGCACAGCC
CTGGGAGACGACTTCCGACCTATCCAGCCTCTGAACGAACGTAGTGTGCTGACCACTCGA
CCCACTGGACCTGGTAAAATTGTACGAAATTGA