

ОТЗЫВ
официального оппонента
на диссертацию Никитенко Екатерины Дмитриевны
на тему «Тонкая морфология, развитие и регенерация спикульного
комплекса *Onchidoris muricata* (Doridina, Nudibranchia, Mollusca)»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.12. Зоология

Диссертационная работа Е.Д. Никитенко посвящена изучению уникальных внутриклеточных субэпидермальных спикул голожаберного моллюска *Onchidoris muricata* — структур, формирующихся в ходе постларвального онтогенеза и репаративной регенерации. Автор ставит перед собой цель комплексного анализа морфологии, химического состава, молекулярных механизмов минерализации и регенерации спикул, что представляет значительный интерес как для зоологии и биологии развития, так и для прикладных направлений, таких как биомиметика и материаловедение. Исследования о строении и динамике спикульного комплекса у гетеробранхий очень малочисленны и никогда еще не достигали уровня, сопоставимого по масштабу и сложности, с диссертацией Екатерины Дмитриевны.

1. Актуальность избранной темы

Актуальность исследования не вызывает сомнений. Спикулы как биоминеральные структуры широко распространены среди беспозвоночных, однако их внутриклеточное расположение у голожаберных моллюсков в течение всей жизни является уникальным феноменом, изученным крайне фрагментарно. Работа восполняет существенный пробел в понимании эволюционного разнообразия механизмов биоминерализации, демонстрируя альтернативный путь формирования кальциевых структур, отличный от классических моделей (раковин моллюсков, спикул губок или иглокожих). Практическая значимость

работы связана с перспективой использования принципов биоминерализации *O. muricata* для разработки новых композитных материалов, что особенно актуально в контексте современных биотехнологических задач.

Автор обоснованно подчёркивает, что внутриклеточные спикулы дорид, в отличие от внеклеточных скелетных элементов других моллюсков, требуют принципиально иных механизмов регуляции роста и созревания. Это делает выбранный объект исключительно ценной модельной системой для изучения клеточных и молекулярных основ биоминерализации.

2. Обоснованность положений, выносимых на защиту

Первое положение об эктодермальном происхождении спикул подтверждается данными о вероятной миграции Икс-клеток из базального слоя эпителия в субэпидермальное пространство, где они дифференцируются в склероциты. Гистологические и ультраструктурные исследования демонстрируют связь Икс-клеток с формированием внутри крупной вакуоли органического матрикса спикул. Сравнительно-морфологический анализ процессов биоминерализации у моллюсков также согласуется с эктодермальным происхождением спикул *O. muricata*. Будучи обоснованным на современном методическом уровне, это положение побуждает провести в будущем поиск общих молекулярных маркеров Икс-клеток и склероцитов, а также осуществить прямые эксперименты с мечением клеток эпителия и прослеживания их судьбы.

Второе положение о сходстве механизмов минерализации основано на закономерностях взаимодействия клеток, внеклеточного матрикса и внутриклеточного содержимого вакуоли склероцита, а также выявлении участия карбоангидразы в минерализации спикул. Интересными являются предложения о регуляторной роли ВКМ в формировании системы спикул, что может быть аналогичным взаимодействию соединительнотканых и скелетных элементов в развитии позвоночных. Метод *in situ* гибридизации подтверждает экспрессию гена CA01-3 в склероцитах, однако отсутствие биохимической верификации

ферментативной активности карбоангидразы и филогенетического анализа её ортологов у других животных ограничивает уверенность этого аргумента.

Третье положение о формировании спикул при регенерации убедительно доказано на экспериментальной модели восстановления ринофоров. Автор демонстрирует, что спикулы формируются *de novo* в регенерационной почке, повторяя онтогенетические стадии нормального развития. При этом воспроизводятся особенности ультраструктуры эпителия, отношения фибробластов, ВКМ и склероцитов, а также рост и дифференцировка спикул. Безусловным усилением этой части работы могло бы стать изучение экспрессии карбоангидразы при регенерации.

3. Достоверность и новизна научных выводов

Основные выводы работы обладают высокой степенью достоверности, подкреплённой комплексом методов: прижизненные наблюдения, световая и электронная микроскопия, Рамановская спектроскопия, иммуногистохимия, гибридизация *in situ*. Впервые детально описаны онтогенетические преобразования спикул, включая изменение их химического состава (переход от рыхлых полых структур к монолитному кальциту) и пространственной организации спикульных трактов. Особого внимания заслуживает детальное описание Икс-клеток — вероятных предшественников склероцитов, мигрирующих из эпителия в субэпидермальное пространство. Все ключевые результаты и выводы изложены в опубликованных работах соискателя, личный вклад которого в проведение всех этапов работы не вызывает сомнений.

Новизна работы заключается в следующих аспектах:

- Установление связи между онтогенетической динамикой эпителия и спикулогенезом.
- Доказательство способности к *de novo* регенерации спикул у половозрелых особей.

- Первое применение Рамановской спектроскопии для анализа состава спикул голожаберных моллюсков.

4. Замечания и вопросы

1. В описании результатов зачастую даются количественные оценки размера, числа и их динамики относительно спикул и клеток. Однако эти утверждения подкреплены только двумя таблицами (3.1 и 3.2), в которых представлены цифры без указания объема выборок и значений погрешности. Более того, в таблице 3.1 заявлены значения средней длины/ширины спикул, но не уточняется о какой средней идет речь (средняя арифметическая, средняя структурная (медиана) и т.д.). В тексте нет описания каких-либо математических процедур, что свидетельствует об отсутствии строгой статистической проверки количественных данных. Особенно выделяется спекулятивность утверждений на стр. 51 (раздел обсуждение): «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.». Вместе с тем, такие количественные оценки в цифрах, особенно относительно динамики Икс-клеток и фибробластов, было бы очень полезно произвести и убедиться в сделанных утверждениях.

2. В обзоре литературы указано, что карбоангидразы – это мультигенное семейство, в котором недостаточно изучено разнообразие белков беспозвоночных. Однако специфика выбранного для изучения гена карбоангидразы у онхидориса никак не обоснована. Откуда взялось название карбоангидразы CA01-3, какова ее доменная организация не описано и как результаты по экспрессии РНК согласуются с зонами предшественников и самими склероцитами не проанализировано в обсуждении. Изучаемый белок совершенно несправедливо назван в тексте результатов и обсуждения «регуляторным». Под регуляторными понимают белки, контролирующие

экспрессию других генов, а карбоангидраза кодирует фермент, играющий структурную роль, она и является конечным эффектором регуляторных взаимодействий. Важным дополнительным аспектом анализа, который следовало бы провести, представляется сравнение пространственно-временной динамики экспрессии ортологов карбоангидразы у других животных, что позволило бы более надежно обсуждать генетические аспекты биоминерализации. Учитывая раннюю активность карбоангидразы онхидориса в области тела, соответствующей мантийной складке раковинных моллюсков, интереснейшим вопросом является ультраструктурная организация этой зоны. Этот ценнейший результат работы, выполненный на самом современном методическом уровне и обладающий исключительно большой новизной, не получил должного внимания. Логичным шагом также выглядит изучение экспрессии карбоангидразы в ходе регенерации ринофора.

3. В описании внутреннего устройства регенерирующего ринофора есть некоторые противоречия. В частности, форма и внутренняя организация регенератов на 2 дпа по данным СЭМ имеет однородное содержимое из поперечно ориентированных волокон, что не соответствует картинам полутонких срезов, представленным для стадий 1 и 3 дпа, на которых хорошо читается покровный эпителий и рыхлое содержимое почки. Выстраивание в ряд клеток-предшественников стенки лимфатической полости отмечено только на 7 дпа, однако на рисунке 3.49 А и Б подписано, что лимфатическая полость есть в регенерационной почке уже на 2 дпа. Вероятно, это можно объяснить вариабельностью динамики восстановительных процессов, чему следовало бы уделить большее внимание.

4. Учитывая справедливость выводов 1 и 4, а также динамику появления спикул и Икс-клеток в ходе регенерации ринофоров, хотелось бы уточнить, как можно объяснить более позднее (по сравнению с появлением спикул) присутствие Икс-клеток в эпителии, в том числе на стадиях, когда новые спикулы

не закладываются? Какую дополнительную или альтернативную функцию могут выполнять Икс-клетки?

5. В интерпретации процесса кальцификации начальной стадией указана полая спикула, у которой затем появляется внутренний коллагеновый матрикс. Каким образом можно объяснить проникновение белкового компонента через сплошную карбонатную стенку спикулы?

6. В результатах автор отмечает отклонение метрик Рамановской спектроскопии от эталонного кальцита для некоторых спикул. Как это характеризует химическую природу спикул?

7. В описании регенератов 7 и 10 дпа отмечены картины «изрезанной базальной пластинки», подстилающей эпителиальные клетки с отростчатой базальной поверхностью. Что это может означать?

Подводя итог, отмечу, что диссертация Е.Д. Никитенко представляет собой грамотное, разностороннее и очень интересное исследование, вносящее значительный вклад в понимание механизмов биоминерализации и регенерации у беспозвоночных. Работа выполнена на высоком методическом уровне, сочетающем традиционные морфологические подходы с современными молекулярными методами. Полученные результаты обладают выраженной новизной и теоретической значимостью, открывая перспективы для глубокого изучения уникальных эволюционных адаптаций на уровне клеточных и молекулярно-генетических процессов. Несмотря на отдельные недочёты, работа производит очень благоприятное впечатление и заслуживает высокой оценки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.12. Зоология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным п.п. 2.1-2.5 «Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном

университете имени М. В. Ломоносова». Диссертационная работа оформлена согласно требованиям «Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова».

Таким образом, соискатель Екатерина Дмитриевна Никитенко заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.12. Зоология.

Официальный оппонент:

Козин Виталий Владиславович

кандидат биологических наук,

ведущий научный сотрудник,

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», биологический факультет, кафедра эмбриологии

199034, Россия, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 7–9

Контактные данные:

Тел. +

E-mail

10.03.2025

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.03.05 – «Биология развития, эмбриология».

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Козина В.В. удостоверяю: