

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Никитенко Екатерина Дмитриевна

**Тонкая морфология, развитие и регенерация спикульного комплекса
Onchidoris muricata (Doridina, Nudibranchia, Mollusca)**

1.5.12 Зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре зоологии беспозвоночных
биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научный руководитель** – *Ворцепнева Елена Владимировна – доктор биологических наук*
- Официальные оппоненты** – *Кантор Юрий Израилевич – доктор биологических наук, ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН, лаборатория морфологии и экологии морских беспозвоночных, ведущий научный сотрудник*
- Чернышев Алексей Викторович – доктор биологических наук, доцент, ФГБУН Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, лаборатория эмбриологии, главный научный сотрудник*
- Козин Виталий Владиславович – кандидат биологических наук, ФБГОУ Санкт-Петербургский государственный университет, биологический факультет, кафедра эмбриологии, ведущий научный сотрудник*

Защита диссертации состоится «17» марта 2025 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.8 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

Е-mail: ksenperf@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.8/3328>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат наук



К.С. Перфильева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

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, 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, в большинстве случаев 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, данные о строении спикул ограничиваются описанием внешней морфологии и разрозненными данными о химическом составе. Внешняя морфология спикул известна лишь для 20 видов дорид, данные об особенностях их внутреннего

строения — вовсе только для 13 видов. В литературе встречаются упоминания о наличии в составе спикул голожаберных моллюсков карбоната кальция или магния, точная изоформа которых не установлена. Также без подробностей упоминается наличие примесей магния и органических веществ (Woodland, 1907; Odum, 1951; Cattaneo-Vietti et al., 1995; Weiner et al., 2003). Процессы формирования, роста, минерализации и регенерации внутриклеточных спикул до сих пор остаются не изучены.

Комплексный подход к изучению онтогенетической динамики морфологии спикул, их химического состава, особенностей процесса биоминерализации и регенерации, позволит не только ответить на фундаментальные вопросы о происхождении и эволюции биоминеральных структур животных, но и найти применение в прикладных направлениях науки, таких как материаловедение, биотехнология и медицина.

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.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования являются уникальные субэпидермальные спикулы голожаберного моллюска *O. muricata* (Nudibranchia, Gastropoda). Предметом исследования является внешняя и внутренняя морфология покровов *O. muricata*, включая спикульный комплекс; особенности процессов роста, минерализации, преобразования химического состава спикул, в том числе на молекулярном уровне, а также особенности процесса регенерации спикульных органов на примере ринофоров и папилл и спикулогенез во время репаративной регенерации *O. muricata*.

Научная новизна. Настоящая работа является первым комплексным исследованием преобразования субэпидермальных спикул моллюсков на примере голожаберного моллюска *O. muricata* в онтогенезе. 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, вероятно, участвующие в спикулогенезе; 3) выявить единовременное формирование пула спикул и образования спикульных трактов на ранних ювенильных стадиях *O. muricata*, с дальнейшим увеличением лишь линейных размеров спикул; 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 первые данные о вероятных молекулярных механизмах регуляции кальцификации субэпидермальных спикул. Методом *in situ* гибридизации визуализированы паттерны экспрессии карбоангидразы во время спикулогенеза 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 спикулогенезу. На основе всех полученных данных предложен наиболее вероятный путь формирования склероцитов в процессе онтогенеза и при посттравматической регенерации *O. muricata*.

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате анализа полученных данных сформировано представление о динамике изменений химического состава, процессах развития и минерализации, онтогенетической динамике внешней и внутренней морфологии спикул голожаберных моллюсков на примере *O. muricata*. Предложена гипотеза формирования уникальных внутриклеточных субэпидермальных кальцитовых спикул: формирование начинается в Икс клетках, в составе псевдостратифицированного покровного эпителия, с последующей их миграцией в соединительно-тканное пространство, где они преобразуются в нормальные склероциты. 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 безраковинных моллюсков поможет ответить на вопросы о гомологии субэпидермальных внутриклеточных спикул и эволюционном происхождении этих кальциевых структур в близких группах брюхоногих безраковинных моллюсков (*Asochlidiomorpha*, *Rhodopemorpha*).

Полученные данные об уникальной внутриклеточной кальциевой минерализации, характерной для представителя голожаберных моллюсков *O. muricata*, позволяют расширить представления о механизмах биоминерализации среди многоклеточных животных. Результаты данной работы являются фундаментальной основой для будущего детального сравнительного анализа твердых скелетных структур разных животных, причем как беспозвоночных, так и позвоночных.

В рамках настоящей работы выявлены различия в регенеративных возможностях ринофоров и папилл среди представителей двух групп голожаберных моллюсков (отрядов *Doridina* и *Cladobranchia*), что говорит о различных регенерационных потенциях даже внутри отрядов. Выявлена наиболее успешная модель для изучения спикулогенеза половозрелых особей *O. muricata* — посттравматическая регенерация ринофоров. Полученные данные позволяют расширить представление о разнообразии механизмов формирования и возобновления биоминеральных структур у беспозвоночных. Материалы данной работы войдут 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.

Методология и методы исследования. В данной работе применялись два основных методологических подхода — сравнительно-морфологический и экспериментальный. Исследования морфологии проводили классическими методами световой, сканирующей и трансмиссионной электронной микроскопии, а также компьютерной микротомографии. В работе были использованы гистологические методы, методы иммуногистохимии с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа и методы построения трехмерных моделей по сериям полутонких срезов. Химический состав спикул был изучен с помощью биофизических методов — Рамановской спектроскопии и

энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Для изучения кальцификации спикул и регуляции процесса минерализации на молекулярном уровне были проведены эксперименты по отложению кальция в спикулах и гибридизация *in situ*. Для изучения спикулогенеза при посттравматической регенерации также были поставлены серии экспериментов.

Совокупность примененных методов, позволила выявить основные стадии преобразования покровов, формирования и развития спикул на постличиночных стадиях онтогенеза *O. muricata*. Данные, полученные с помощью экспериментальных методов изучения минерализации спикул, а также регенерации существенно дополнили представления о спикулогенезе. Совокупность полученных данных легла в основу сравнительно-морфологического анализа.

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.

Степень достоверности работы. Согласованные результаты, полученные с использованием различных общепринятых методов, обеспечивают высокую степень достоверности данных. В работе использованы протоколы пробоподготовки материала, опубликованные в рецензируемых научных изданиях. Дизайн экспериментов соответствует современным правилам проведения исследования. Достоверность подтверждается достаточным количеством наблюдений в необходимом количестве повторностей с применением контролей. Кроме того, результаты работы опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых международных журналах и представлены на семнадцати конференциях всероссийского и международного уровня.

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 водозащитной 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 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.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены и обсуждены на следующих конференциях: Беломорская студенческая научная сессия СПбГУ (2018, 2019, 2022), Международная научно-практическая конференция «Морские исследования и образование. MARESEDU» (2018, 2019, 2021), XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" (2017, 2018, 2021), Юбилейная конференция в честь 160-летия кафедры зоологии беспозвоночных «Зоология беспозвоночных – новый век» (2018), International Seminar on Biodiversity and Evolution of Mollusks (2019), Euromal 2021: 9th European Congress of Malacological Societies (2021), XIV Всероссийская конференция с международным участием "Проблемы изучения, рационального использования и охраны природных ресурсов Белого моря" (2022), Всероссийская научная конференция с международным участием, посвященная 85-летию Беломорской биостанции им. Н.А. Перцова Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (2023).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 статей в научных журналах, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus. Вклад соискателя во всех опубликованных работах является определяющим и отражён в списке публикаций на стр. 25.

Структура диссертации. Текст работы изложен на 182 страницах и состоит из глав «Введение», включая обзор литературы, «Материал и методы исследования», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», также «Список литературы» и «Приложения». Список литературы включает 160 источников. Приложения представлены 7 таблицами, иллюстративным материалом (всего 75 изображений) и протоколами пробоподготовок и фиксаций.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Введение

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

2. Обзор литературы

Обзор литературы посвящен разнообразию спикул беспозвоночных животных, в том числе моллюсков, и регенерации спикул. Описание разнообразия спикул включает данные об химическом составе, форме, функциях, формировании и локализации спикул в теле разных беспозвоночных животных. Также в главе приведены данные о строении органического матрикса спикул, процессе минерализации и данные по регуляции минерализации, в том числе на молекулярном уровне.

3. Материал и методы

Материал. В настоящей работе было изучено более 900 особей *Onchidoris muricata* на разных стадиях постличиночного развития. Выбор объекта был обусловлен его широким распространением в акватории Белого моря вблизи ББС МГУ им. Н.А. Перцова, лёгкой доступностью, удобными размерами и хорошо развитым спикульным комплексом. Особи *O. muricata* размером от 1 до 12 мм (максимально возможных в Белом море) были собраны вручную на литорали или легководолазным 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.

Методы. В исследовании был применен комплексный подход к изучению формирования и преобразования спикульного комплекса в онтогенезе. Для изучения пространственной организации спикульных сетей были использованы методы световой микроскопии (80 исследуемых особей), а также компьютерной микротомографии (14 особей). Изучение внешней и внутренней морфологии спикул проводилось с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (126 особей). Ультратонкое строение стенки тела *O. muricata*, в том числе спикулогенных клеток — склероцитов, было изучено с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) (82 особи). Для изучения строения склероцитов помимо ТЭМ, был применен метод трехмерной реконструкции по серии полутонких срезов (10 особей). Для изучения химического

строения спикул на разных стадиях онтогенеза были применены методы: иммуногистохимии — для выявления органических соединений (94), энерго-дисперсионной спектроскопии (ЭДС) — для изучения элементного состава и распределения элементов внутри спикул (30 особей), и Рамановской спектроскопии — для определения химического состава спикул (15 особей). Для определения зон отложения кальция в спикулах были поставлены эксперименты с использованием флуорохрома динатриевой соли кальция (кальцеина) (90 особей). В настоящей работе также была проведена гибридизация *in situ* для определения участия гена карбоангидразы в минерализации спикул (145 особей). Для изучения спикулогенеза на поздних стадиях онтогенеза *O. muricata* были поставлены эксперименты по регенерации ринофоров продолжительностью 27 дней на 214 половозрелых особях.

4. Результаты

Первая часть главы результатов посвящена нормальной морфологии тела *Onchidoris muricata*, вторая — онтогенетическим преобразованиям спикул, третья — процессу регенерации и спикулогенезу.

Преобразование нормального строения тела *O. muricata*. В этой части результатов описано преобразование тела *O. muricata* на постличиночных этапах развития (Рис. 1). Стенка тела *O. muricata* состоит из покровного эпителия, соединительнотканного слоя из внеклеточного матрикса, образованного коллагеновыми волокнами, нервных и мышечных элементов, а также хорошо развитого спикульного комплекса.

Спикульный комплекс. Спикульный комплекс *O. muricata* (Рис. 2А, Б) сформирован одноосными, двуосными, трехосными и четырехосными спикулами (Рис. 2В). Внешняя морфология спикул ринофоров отличается от морфологии спикул стенки тела (Рис. 2Г). Спикулы тела *O. muricata* расположены не хаотично, а формируют оформленные скопления — тракты. Формирование спикульных трактов стремительно происходит у ювенилей после метаморфоза, что напрямую связано с развитием частей тела моллюска. Выделены горизонтальные тракты в ноге и нотуме, вертикальный — в папиллах, звездчатый — в основании папилл и колодцеобразный тракт — в ринофорах.

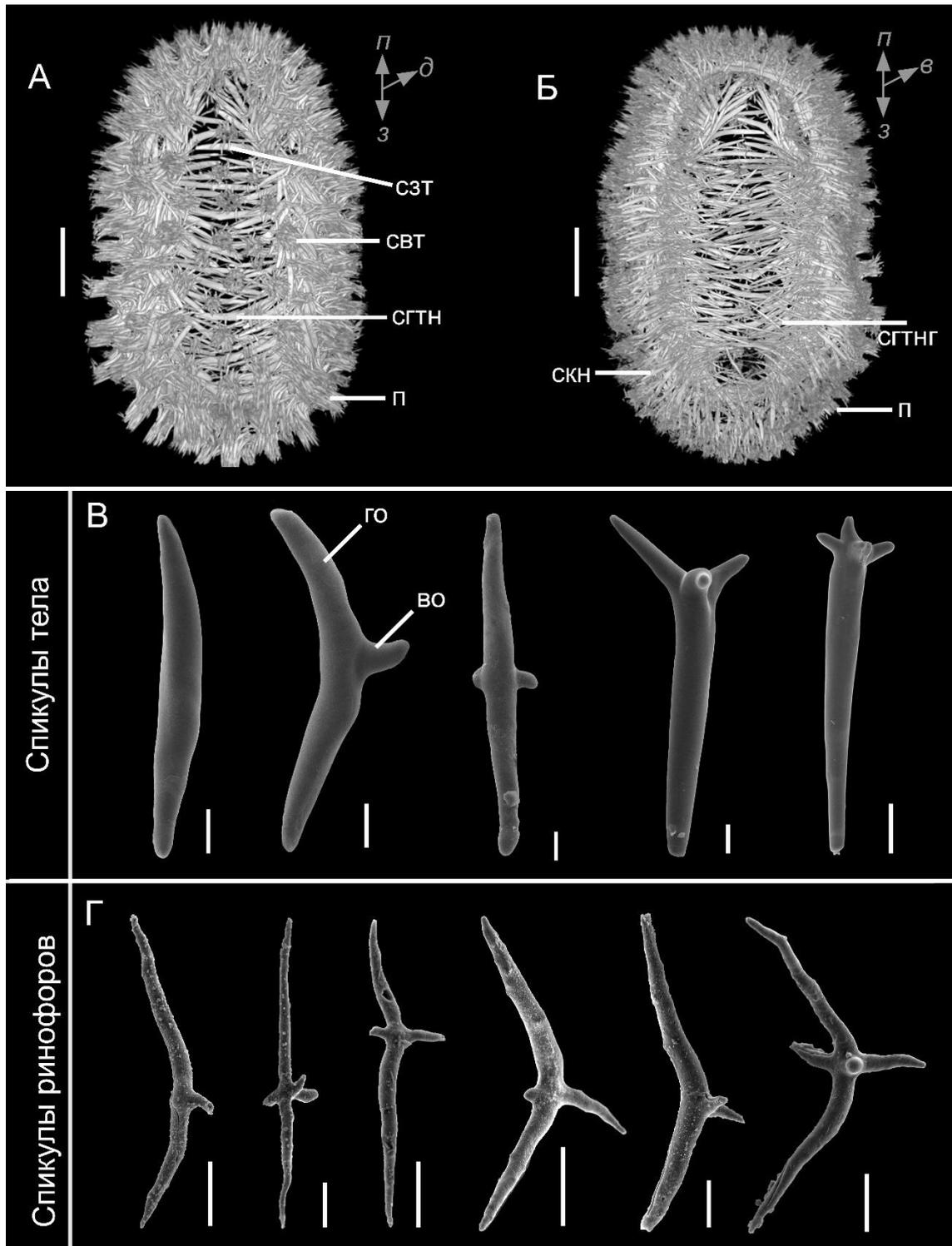


Рисунок 2. Спикульный комплекс *Onchidoris muricata*. А, Б – спикульная сеть. Отдельные спикулы тела и ринофоров. Сокращения: во – вторичная ось спикулы; го – главная ось спикулы; п – папилла; свт – спикулы вертикального тракта; сгтн – спикулы горизонтального тракта нотума; сгтнг – спикулы горизонтального тракта ноги; сзт – спикулы звездчатого тракта; скн – спикулы края нотума. Обозначения осей: в – вентральная; д – дорсальная; з – задняя; п – передняя. Масштаб: А, Б – 600 мкм В, Г – 30 мкм.

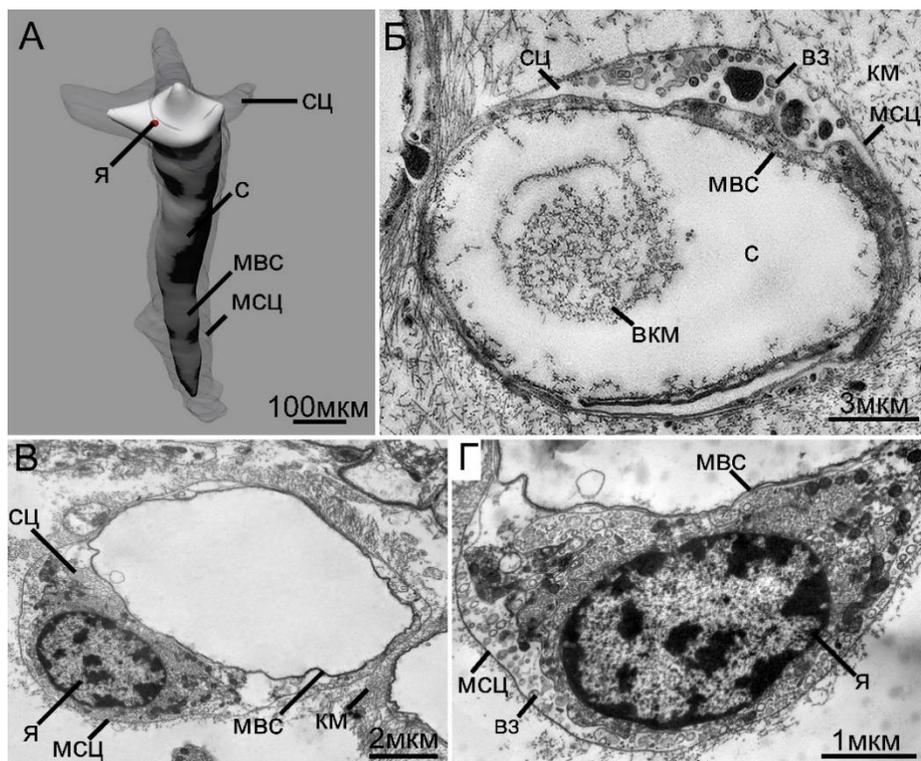


Рисунок 4. Строение склерита *Onchidoris muricata*. А – трехмерная модель склерита. Б – В – ультратонкое строение склерита с внутриклеточным матриксом ювенили (Б) и без внутриклеточного матрикса взрослой особи (В, Г). Обозначения: в3 – везикула; вкм – внутриклеточный матрикс; км – коллагеновый матрикс; мвс – мембрана вакуоли склерита; мсц – мембрана склерита; с – спикула; сц – склерит; я – ядро.

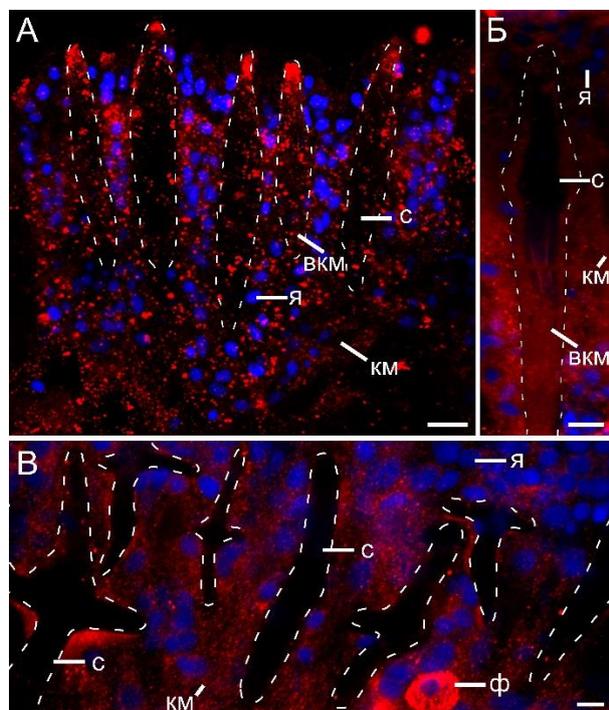


Рисунок 5. Коллаген в нотуме и спикулах *Onchidoris muricata* (иммуногистохимическая окраска против коллагена IV типа (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия)). Красный – коллаген; синий – ядра (DAPI); белые пунктирные линии – контуры спикул. А – ранние ювенили *O. muricata* размером до 2 мм; Б – ювениль размером 2-4 мм; В – половозрелая особь. Обозначения: вкм – внутриклеточный матрикс; км – коллагеновый матрикс; с – спикула; ф – фибробласт; я – ядро. Масштаб: А – 20 мкм; Б, В – 10 мкм.

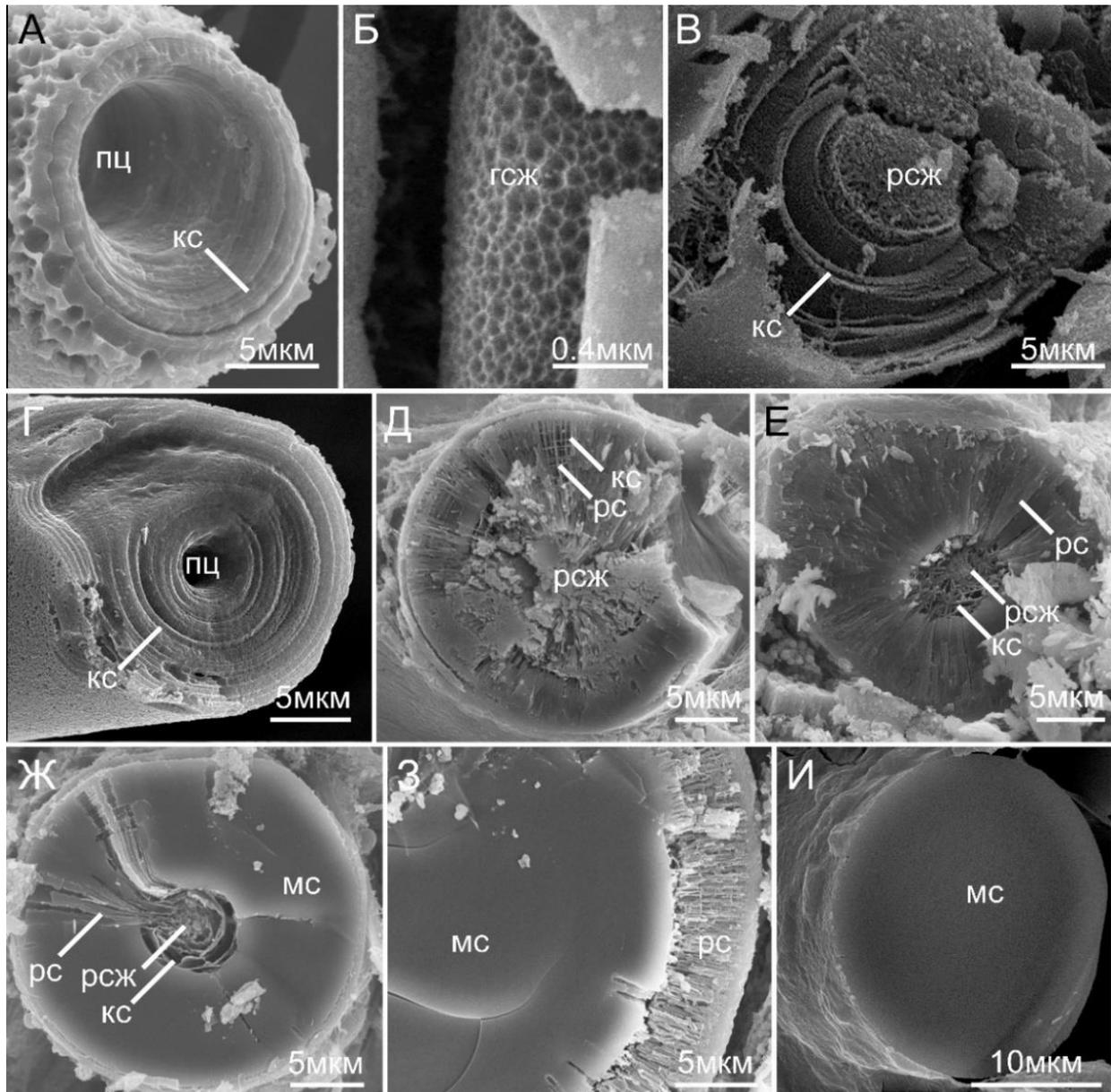


Рисунок 6. Особенности внутренней морфологии спикул *Onchidoris muricata* на разных стадиях онтогенеза (СЭМ). А–И – спикулы тела; К–М – спикулы ринофоров. А – спикула ранних ювенилей с полым центром и concentрическими слоями оболочки; Б – рыхлая спикула ранних ювенилей с губчатым содержимым; В – спикула ювенили с рыхлым центром и concentрическими слоями по периферии; Г – спикула ювенили с полым центром и concentрическими слоями по периферии; Д – спикула неполовозрелой особи со смешанной внутренней структурой, имеет рыхлый центр, радиальные и concentрические слои; Е – спикула неполовозрелой особи с рыхлым центром и радиальными слоями по периферии; Ж – спикула неполовозрелой особи с монолитной, concentрической и радиальной внутренней структурой; З – спикула половозрелой особи с монолитным центром и радиальной слоистостью по периферии; И – полностью монолитная спикула половозрелой особи гсж – губчатое содержимое; пц – полый центр; кц – concentрические слои; мс – монолитное содержимое; рсж – рыхлое содержимое; рц – радиальные слои; рсж – рыхлое содержимое.

Химический состав спикул. В основе органической матрицы спикул показано наличие коллагена (Рис. 5) и фосфорилированных белков. В составе спикул на разных стадиях онтогенеза помимо углерода, кислорода, были детектированы кальций, магний и фосфор. Спикулы *O. muricata* состоят из кальцита и магниезального кальцита.

Внутренняя морфология спикул. У *O. muricata* отмечено шесть типов внутренней структуры спикул (Рис. 6). Встречаются полые (Рис. 6А), губчатые (Рис. 6Б), концентрические (Рис. 6В, Г) смешанные (Рис. 6Д–З) и монолитные (Рис. 6И) спикулы.

Минерализация спикул. В процессе развития спикулы *O. muricata* увеличиваются в линейных размерах, становятся более твердыми. Кальцификация наблюдается в концевых участках спикул и менее интенсивно по всей поверхности спикул у ювенилей и неполовозрелых особей (Рис. 7А, Б), при этом прекращается у половозрелых *O. muricata* (Рис. 7В).

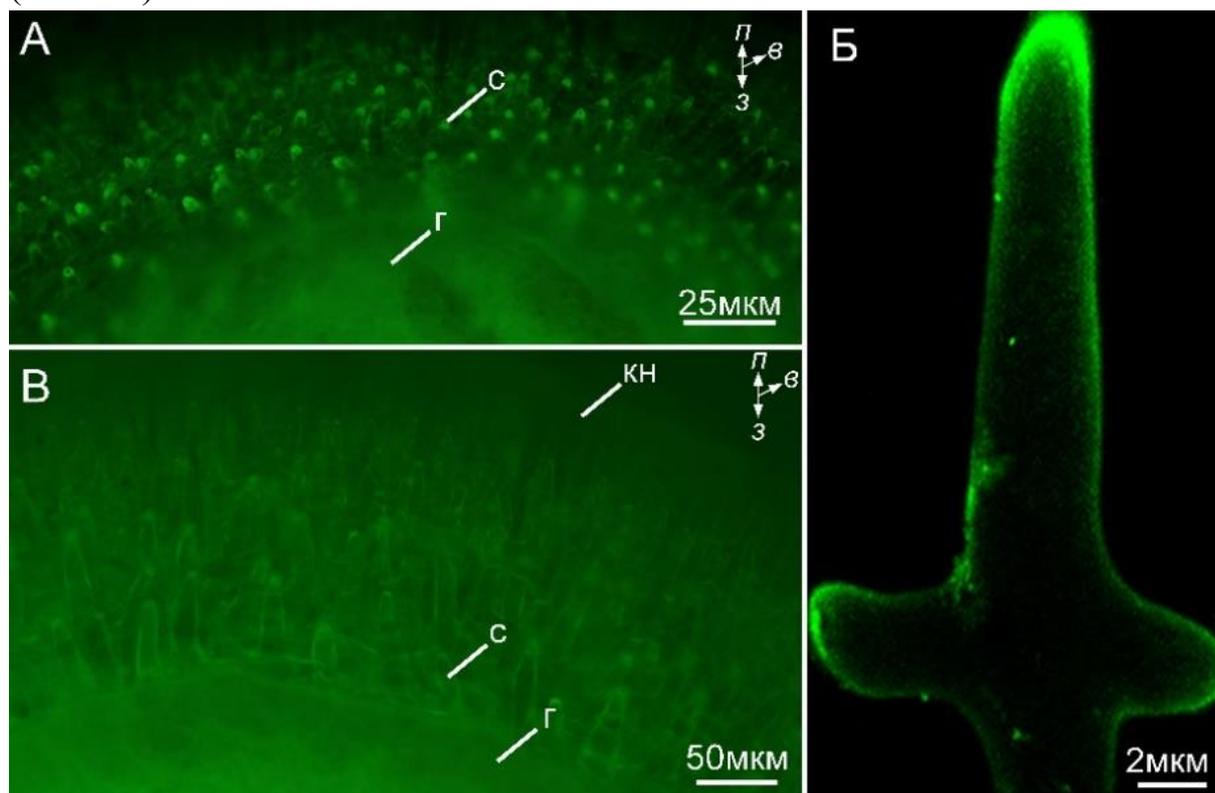


Рисунок 7. Зоны отложения кальция в спикулах *Onchidoris muricata* после 21-дневной экспозиции в динатриевой соли кальция (кальцеине – зеленый; флуоресцентная микроскопия, КЛСМ). А – спикулы вентральной стороны нотума ювенили; Б – выделенная спикула ювенили с зонами кальцификации в концевых участках и по периферии; В – спикулы вентральной стороны нотума половозрелой особи без выраженного сигнала. Обозначения: г – голова; кн – край нотума; с – спикула. Обозначения осей: в – вентральная; д – дорсальная; з – задняя; п – передняя.

Молекулярные механизмы минерализации. В этой части описаны результаты проведения гибридизации *in situ* *O. muricata*, спикулы которых находятся на разных стадиях развития (Рис. 8). По литературным данным было предположено участие белков из семейства карбоангидраз в регуляции минерализации. Экспрессия гена карбоангидразы у *O. muricata* наблюдается в переходной зоне между ногой и нотумом у ранних ювенилей (Рис. 8А, Б), затем на более поздней стадии, визуализируется еще и в склероцитах (Рис. 8В, Г). Экспрессия карбоангидразы в переходной зоне нотума и ноги прекращается у моллюсков размером примерно 2-3 мм, однако продолжается в склероцитах. У половозрелых *O. muricata*, спикулы которых по морфологическим признакам находятся на терминальной стадии развития, экспрессия гена карбоангидразы детектирована не была.

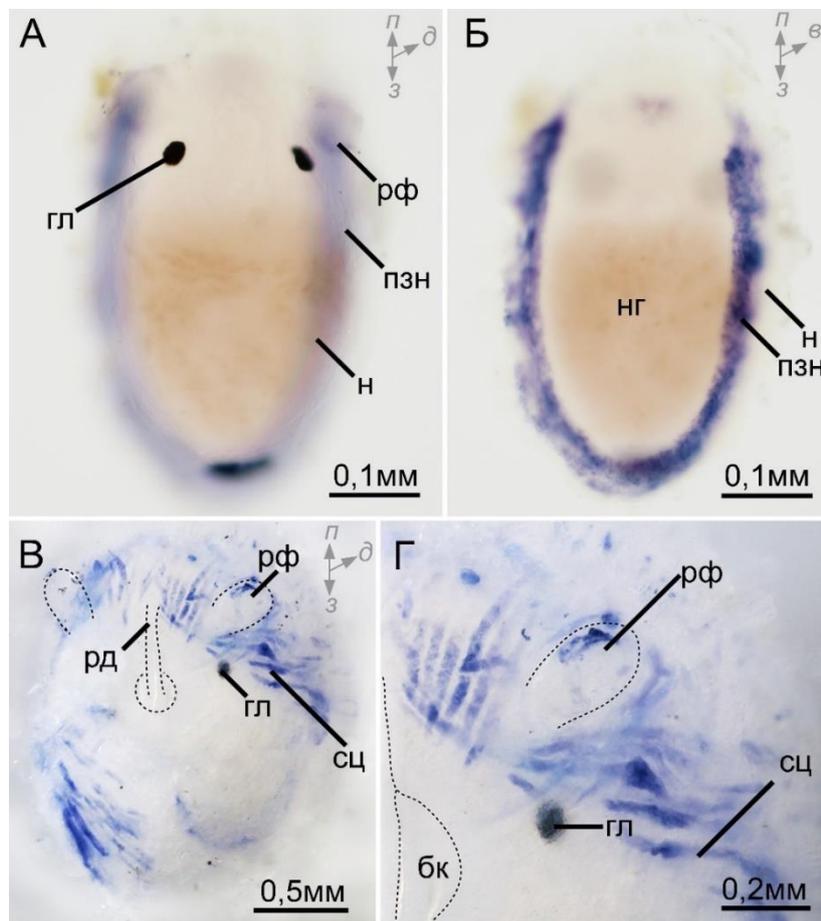


Рисунок 8. Визуализация паттернов экспрессии карбоангидразы (CA01-3) у *Onchidoris muricata* методом *in situ* гибридизации. А, Б – паттерн экспрессии в переходной зоне нотума и ноги ранней ювенили (А – вид с дорсальной стороны; Б – вид с вентральной стороны); В, Г – паттерн экспрессии внутриклеточно в склероцитах ювенили. Обозначения: бк – буккальный комплекс; гл – глаз; нг – нога; н – нотум; пзн – переходная зона ноги и нотума; рд – радула; рф – ринофор; сц - склероцит. Обозначения осей: в – вентральная; д – дорсальная; з – задняя; п – передняя.

Регенерация. В основу этой части результатов вошли данные по подбору оптимальной модели регенерации (Рис. 9), описано строение нормального ринофора, приведена последовательность восстановления ринофора и спикул в нем, в том числе на ультраструктурном уровне.

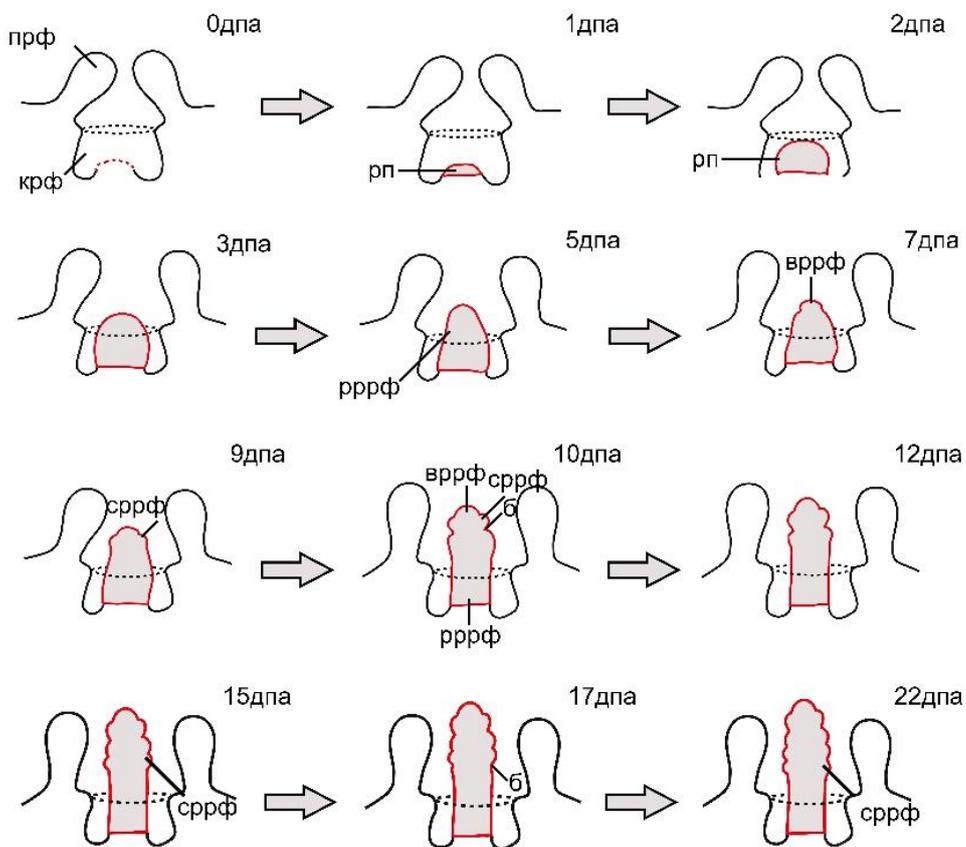


Рисунок 9. Схема восстановления ринофора *Onchidoris muricata* после его полного удаления. Обозначения: б – борозда; vrrf – верхушка регенерирующего ринофора; дпа – день после ампутации; крф – карман ринофора; прф – папилла ринофора; rp – регенерационная почка; rrrf – рахис регенерирующего ринофора; srrf – складка регенерирующего ринофора; красным контуром обозначен внешний вид регенерата; черным пунктиром – границы кармана ринофора.

Спикулы в регенерирующем ринофоре появляются на пятый день регенерации. В эпителии регенерата отмечены многочисленные Икс клетки, формирующие эвагинации в субэпидермальное пространство на длинных мембранных тяжах (Рис. 10А, Б). Размер спикул регенерата существенно меньше спикул интактного ринофора. Ультраструктура формирующегося склероцита отличается от интактного наличием осмиофильной обкладки мембраны вакуоли склероцита подобно Икс клеткам в покровном эпителии (Рис. 10В, Г).

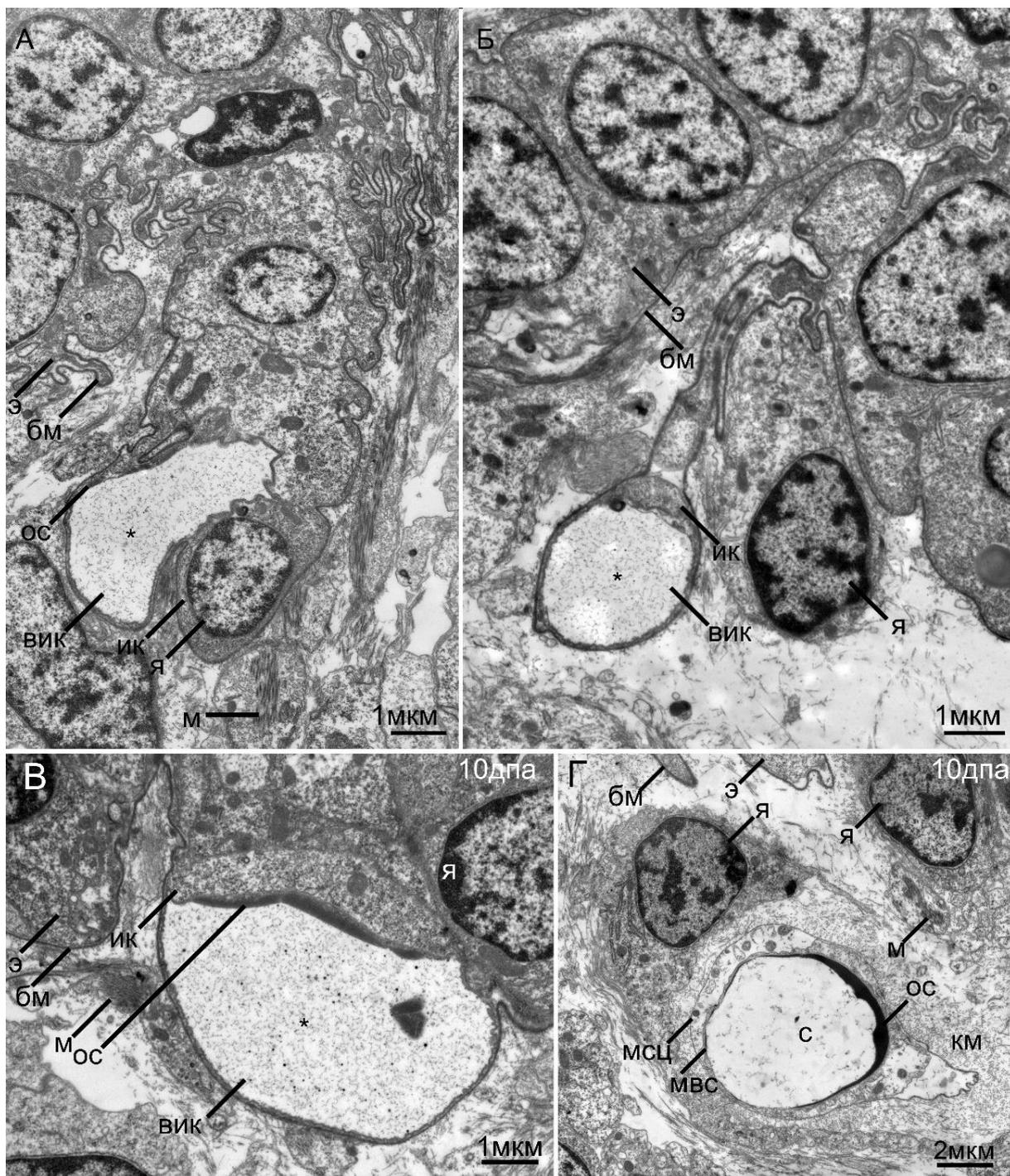


Рисунок 10. Особенности ультраструктуры Икс клеток и склероцитов в процессе регенерации ринофора *Onchidoris muricata* (ТЭМ). А, Б, В – выпячивания Икс клеток в субэпидермальное пространство ринофора; Г – склероцит регенерата, сформированный *de novo*. Обозначения: бм – базальная мембрана; вик – вакуоль Икс клетки; дпа – день после ампутации; ик – Икс клетка; км – коллагеновый матрикс; м – мышца; мвс – мембрана вакуоли склероцита; мсц – мембрана склероцита; ос – осмиофильный слой мембраны вакуоли; с – спикула; э – эпителий; я – ядро; * – мелкозернистое содержимое вакуоли Икс клетки.

5. Обсуждение

Впервые полученные данные о формировании и преобразовании спикульного комплекса в онтогенезе *Onchidoris muricata* описывают спикулогенез уникальных внутриклеточных субэпидермальных спикул моллюсков и существенно дополняют имеющиеся данные о спикулогенезе беспозвоночных животных.

Интересным фактом оказалось, что все спикулы закладываются одновременно на ранних стадиях постличиночного развития, далее спикулы только увеличиваются в размерах, но не количестве. Пространственная организация спикул в тракты также происходит у ювенилей *O. muricata*.

Изучение преобразования внутренней структуры спикул, их элементного и химического состава, особенностей процесса минерализации спикул, в том числе кальцификации позволили выдвинуть гипотезу о пути созревания спикул. Белковый матрикс спикул, состоящий из коллагена и, вероятно, фосфорилированных белков, является матрицей минерализации спикул. Органический матрикс составляет основу спикул ранних ювенилей. При кальцификации органического матрикса у ювенилей *O. muricata*, внутренняя структура спикул преобразуется в смешанную, характеризующуюся концентрической и радиальной слоистостью. Далее спикулы со смешанной внутренней структурой преобразуются в монолитные у взрослых особей. Однако, кальцификация и рост таких спикул прекращаются.

Проведение гибридизации *in situ* с антисмысловыми зондами к гену карбоангидразы выявило закономерность между зоной экспрессии гена и стадией формирования спикул (Рис. 8). Экспрессия гена у разновозрастных моллюсков отмечена в разных зонах. Изначально у ранних ювенилей сигнал локализован в переходной зоне нотума и ноги (Рис. 8А, Б), затем у ювенилей начинает появляться в центральной части нотума, причем сигнал локализован внутриклеточно в склероцитах, как в перинуклеарной области, так и в вакуоли со спикулой (Рис. 8В, Г). Полученные данные позволили предположить влияние карбоангидразы на процесс минерализации спикул, подобно ее функциям в других группах беспозвоночных животных. Полученные данные свидетельствуют о функциональной конвергенции карбоангидраз в разных группах живых организмов.

Эксперименты по регенерации показали, что полностью удаленный ринофор у половозрелых особей — удобная модель для исследования

спикулогенеза, поскольку позволяет удалить все интактные спикулы внутри ринофора. В репаративной регенерации ринофора можно выделить три этапа, которые также отмечены в регенерации частей тела для других многоклеточных животных, несмотря на высокую изменчивость и вариабельность способов регенерации (Tiozzo, Copley, 2015; Videau et al., 2021): 1) закрытие раны путем образования регенерационного эпителия и общая реакция организма на травму; 2) индукция регенерации, обычно путем привлечения предшественников клеток различных типов и образование бластемы; 3) морфогенез, включающий формирование, дифференцировку и рост поврежденного органа. Отличия во внешней морфологии спикул и ультратонком строении склероцитов регенерата от спикул интактного ринофора позволили установить, что формирование спикул происходит *de novo*, повторяя путь нормального онтогенеза.

Фундаментальной задачей, на решение которой направлена настоящая работа — выяснение происхождения спикул в онтогенезе. Было предположено, что внутриклеточные субэпидермальные спикулы брюхоногих безраковинных моллюсков имеют эктодермальное происхождение, подобно другим скелетным структурам первичноротых животных. Для решения данной проблемы помимо изучения преобразования спикул в субэпидермальном пространстве, были проведены исследования онтогенетической динамики покровов *O. muricata*. В результате сравнительного анализа морфологии эпителия на разных стадиях онтогенеза *O. muricata*, преобразования склероцитов на разных стадиях развития, а также особенностей регенерации на ультратонком уровне, впервые удалось выявить вероятных предшественников склероцитов — Икс клетки (Рис. 11). Икс клетки имеют эктодермальное происхождение, формируют эвагинации из покровного эпителия в субэпидермальное пространство (Рис. 11Б–Д), куда вероятно мигрируют путем перетяжки после формирования мембранного тяжа (Рис. 11Е, Ж). Далее в субэпидермальном пространстве в их вакуоли растут и минерализуются спикулы (Рис. 11З). Следовательно, Икс клетки в покровном эпителии, вероятно, являются предшественниками склероцитов.

6. Заключение

Результаты данной работы являются первыми данными о спикулогенезе и онтогенетическим преобразованиям уникальных субэпидермальных внутриклеточных спикул моллюсков на примере *Onchidoris muricata*. В настоящей работе сформулирована гипотеза о

способе формирования и минерализации кальцитовых спикул у голожаберных моллюсков, предложен вероятный путь преобразования внутренней структуры спикул, выявлены вероятные регуляторные белки минерализации *O. muricata* разных возрастов — карбоангидразы.

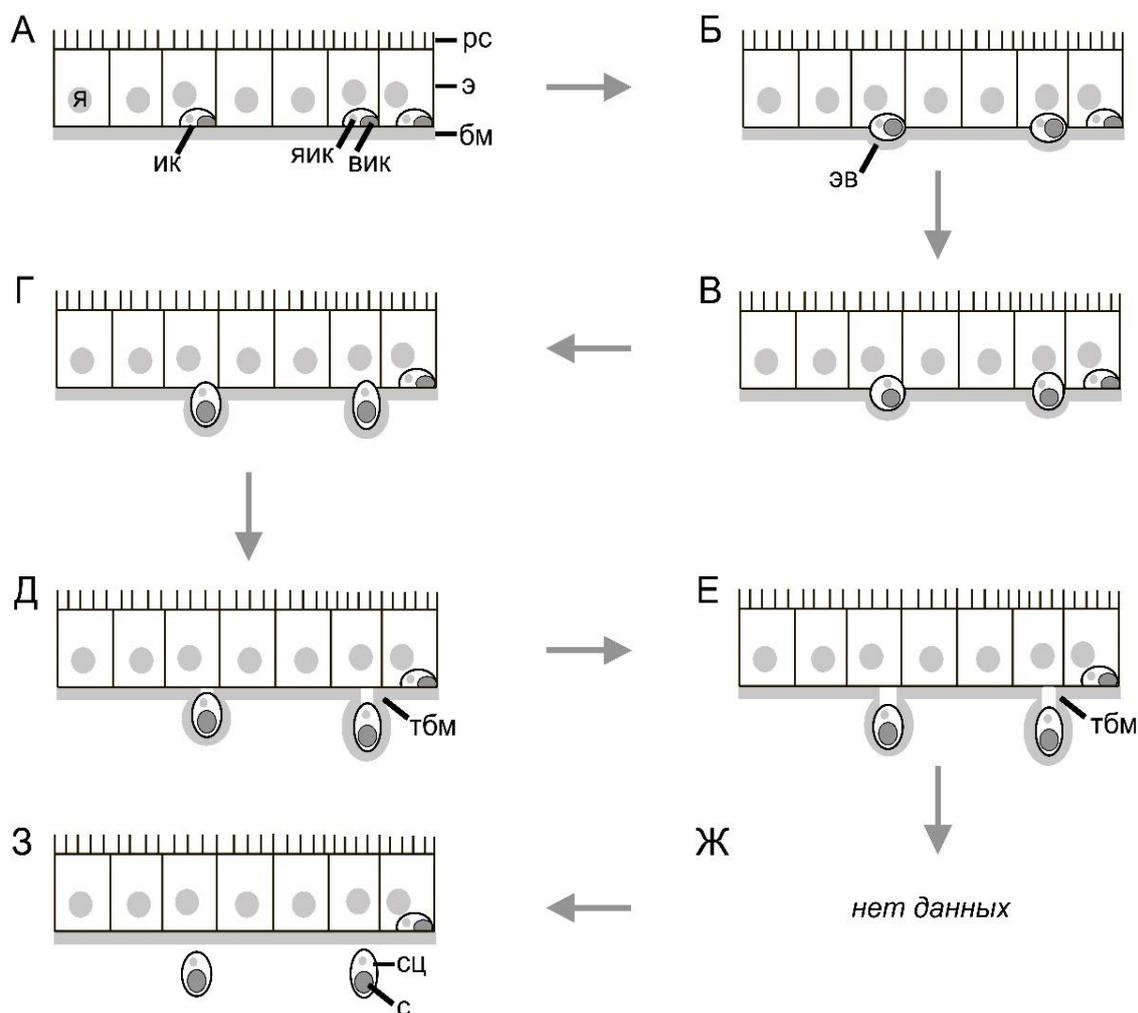


Рисунок 11. Гипотеза формирования склероцита в онтогенезе *Onchidoris muricata* (схема). А – инициация Икс клеток в эпителии ранних ювенилей; Б – увеличение размеров вакуоли Икс клеток с мелкозернистым содержимым, начало формирования выпячивания в субэпидермальное пространство; В, Г – продолжение формирования 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.

Полученные данные свидетельствуют в пользу гипотезы об эктодермальном происхождении субэпидермальных внутриклеточных спикул *O. muricata*, подобно другим скелетным структурам моллюсков и

биоминеральным структурам всех трохофорных животных. Данные *in situ* гибридизации позволяют предположить функциональную конвергенцию карбоангидраз беспозвоночных животных. Результаты настоящей работы могут послужить фундаментом для будущих исследований в области биологии развития, биоминерализации, биотехнологии и материаловедения.

7. 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.

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 — 18-34-00251 мол_а.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus, Web of Science, RSCI

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 п.л. 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.