

На правах рукописи

Миролюбов Алексей Александрович

Особенности строения интерны корнеголовых раков
(Cirripedia: Rhizocephala)

Специальность: 03.02.11 — Паразитология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Зоологический институт Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, Галактионов Кирилл Владимирович

Официальные оппоненты:

Колбасов Григорий Александрович, доктор биологических наук, Московский государственный университет, ведущий научный сотрудник Беломорской биологической станции

Слюсарев Георгий Сергеевич, доктор биологических наук, Санкт-Петербургский государственный университет, профессор кафедры

Ведущая организация:

Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук

Защита состоится 9 февраля 2021 г. В 14:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.223.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук, по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Зоологического института РАН:
<https://www.zin.ru/boards/00222301/theses.html>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук

Овчинникова Ольга Георгиевна

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Rhizocephala — корнеголовые ракообразные — надотряд уникальных и высоко специализированных облигатных паразитов, входящий в состав инфракласса Cirripedia (усоногие раки). Основной круг хозяев корнеголовых — десятиногие ракообразные. Являясь одними из самых сильно модифицированных многоклеточных паразитов, корнеголовые ракообразные представляют большой интерес с точки зрения фундаментальной науки. Однако до сих пор далеко не все аспекты морфофункциональной организации и биологии этих паразитов детально изучены.

Глубокие адаптации к эндопаразитическому образу жизни отразились на многих аспектах биологии ризоцефал. Сильное видоизменение претерпели строение, физиология и жизненные циклы этих животных. Будучи полостными паразитами других ракообразных, корнеголовые раки полностью утратили не только сегментацию, но и практически все остальные признаки, присущие свободноживущим ракообразным. К телу взрослой самки невозможно применять даже понятия осей тела (передне-задней и дорсо-вентральной). Несмотря на значительные морфологические упрощения, ризоцефалы в ходе эволюции приобрели ряд специфических регуляторных механизмов, позволяющих им брать под контроль тело хозяина. Они способны изменять внешний облик, гормональный и физиологический статус, а также поведение зараженного хозяина. Тело взрослого паразита представлено системой ветвящихся нерасчлененных столонов (интерной), расположенных в полости тела хозяина, и мешковидным образованием, вынесенным за пределы тела хозяина и выполняющим репродуктивную функцию (экстерна). Карликовые самцы демонстрируют такую степень редукции, что от них, в конечном счете, остается только сперматогенная ткань, которая инкорпорируется в организм самки в виде ложной «гонады». Пищеварительная система утрачена на всех стадиях жизненного цикла ризоцефал. Питание паразита происходит исключительно через покровы. Полностью отсутствуют какие-либо специализированные распределительные системы и выделительная система. Интерна корнеголовых ракообразных обычно рассматривается как некая гомогенная структура, имеющая одинаковое строение на всем протяжении, однако в последнее время появляется все больше доказательств наличия региональной дифференциации тканей интерны.

Еще одна адаптация к эндопаразитическому образу жизни — это сильно модифицированный жизненный цикл корнеголовых раков. Взрослое животное паразитирует в теле хозяина и производит огромное количество расселительных личинок — науплиусов (единственная стадия жизненного цикла, которая не претерпела значительных изменений). Личинка прикрепляется к хозяину, и в ходе сложного метаморфоза формирует капсулу

(кентрогон), предназначенную для пенетрации покровов хозяина и впрыскивания внутрь его тела группы зародышевых клеток (вермигон). При этом остальное тело личики отмирает. Следует обратить особое внимание на то, что вермигон не наследует от личинки никаких органов, включая нервную и мышечную систему. Однако, согласно литературным данным, у взрослого организма находили мышечные и нервные клетки (Нøег, 1995; Bresciani, Нøег, 2001). К сожалению, литературные данные относительно мышечной системы взрослого организма корнеголовых раков крайне скудны и касаются в основном мускулатуры экстерны. Таким образом, тело взрослого животного полностью формируется заново в течение одного онтогенеза, что безусловно вызывает большой интерес к ризоцефалам.

Кроме того, отмеченное выше регулирующее воздействие корнеголовых раков на организм хозяина подразумевает наличие сложных паразито-хозяинных взаимоотношений. Однако до недавнего времени было не понятно, с помощью каких морфологических структур и молекулярных механизмов, как со стороны паразита, так и со стороны хозяина, осуществляется это взаимодействие.

Все вышесказанное свидетельствует, что до сих пор в биологии корнеголовых ракообразных остается много неисследованных аспектов, что и послужило побудительным мотивом для проведения настоящего исследования.

Цель работы:

На примере нескольких видов корнеголовых ракообразных, относящихся к разным семействам, выявить и описать особенности строения и региональную дифференциацию тканей интерны и проследить ее структурно-функциональные связи с организмом хозяина.

Основные задачи исследования:

1. Исследовать региональную дифференциацию тканей интерны на примере вида *Peltogaster paguri*.
2. Описать строение мышечной системы интерны у представителей двух семейств корнеголовых (Sacculinidae и Peltogastridae) ракообразных и сравнить их.
3. Описать строение столонов паразита, ассоциированных с ганглиями нервной системы хозяина, и сравнить их строение у представителей двух семейств корнеголовых ракообразных (Sacculinidae, Peltogastridae).
4. Исследовать особенности взаимодействия трофических столонов интерны с участками периферической нервной системы хозяина.

Научная новизна

Впервые для представителей таксона *Rhizocerphala* проведено сравнение гистологической структуры столонов в разных участках интерны. Обнаружена региональная дифференциация тканей интерны, найдены и впервые описаны ранее неизвестные структуры, такие как якорный диск и бокаловидные органы.

Впервые для корнеголовых ракообразных обнаружена и описана мышечная система столонов интерны на примере представителей двух семейств (*Peltogastridae* и *Sacculinidae*). Мышечные системы обследованных организмов оказались уникальны по своей архитектонике и не имеют аналогов в животном мире.

Исследован феномен взаимодействия корнеголовых ракообразных с нервной системой хозяина. Обнаружено, что эти паразиты обладают как минимум двумя точками прямого контакта с нервной системой хозяина: (1) специализированные органы (модифицированные столоны), прорастающие в толщу нервных ганглиев брюшной нервной цепочки хозяина, и (2) оплетение трофических столонов паразита периферическими нервами хозяина. При этом части тела паразита, принимающие участие в этом взаимодействии, сильно модифицированы на уровне тканевых и клеточных структур. В местах такого взаимодействия интерна испытывает особую дифференцировку своей структуры и ультраструктуры, что указывает на выполнение специализированных функций, отличных от тех, которые свойственны остальным частям тела паразита.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Корнеголовые ракообразные обладают ярко выраженной региональной дифференциацией тканей интерны. Разные отделы интерны различаются между собой по тканевой организации и ультраструктуре.
- 2) Интерна корнеголовых ракообразных обладает хорошо развитой мышечной системой. Архитектоника этой мышечной системы уникальна и не имеет аналогов среди других животных.
- 3) Корнеголовые ракообразные обладают как минимум двумя точками прямого контакта с нервной системой хозяина.

Теоретическая и практическая значимость

Корнеголовые ракообразные являются одними из наиболее специализированных и, вследствие этого, модифицированных многоклеточных паразитов. Изучение особенностей их строения и характера паразито-хозяйинных взаимодействий важно для понимания и реконструкции эволюции этой группы животных и путей становления паразитизма в целом. Исследование взаимодействия паразитов с нервной системой хозяина позволит лучше понять структуру и функционирование нервных систем беспозвоночных животных.

Кроме того, корнеголовые ракообразные представляют огромный интерес не только для фундаментальной науки, но и для прикладных исследований, так как являются паразитами промысловых видов десятиногих ракообразных. В настоящее время во многих странах идет развитие хозяйств аквакультуры, где в том числе выращиваются и десятиногие ракообразные. Экстенсивность инвазии ризоцефалами в условиях высоких плотностей популяций хозяев может достигать крайне высоких значений. Учитывая, что паразиты вызывают паразитарную кастрацию хозяев, это может приводить к вымиранию маточного стада, к потере товарного качества продукции и, как следствие, к огромным убыткам аквахозяйств. Наше исследование приближает к пониманию физиологии взаимодействий паразитов с их хозяевами и его результаты могут быть использованы при разработке мер борьбы с паразитами в аквакультуре ракообразных.

Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены на следующих конференциях:

- VI Всероссийская конференция с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии» (Севастополь, 2016).
- III Всероссийская конференция с международным участием к 110-летию со дня рождения академика А.В. Иванова «Современные проблемы эволюционной морфологии животных» (Санкт-Петербург, 2016)
- 4-й Международный конгресс по морфологии беспозвоночных (4th International Congress on Invertebrate Morphology) (Москва, 2017)
- Всероссийская конференция «Ракообразные: разнообразие, экология, эволюция» (Москва, 2017)
- Конференция ЗООЛОГИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ – НОВЫЙ ВЕК, посвященная 160-летию со дня основания Кафедры зоологии беспозвоночных Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва, 2018).
- Международная конференция «Современная паразитология — основные тренды и вызовы» (Санкт-Петербург, 2018)
- 2-я Студенческая Научная сессия Учебно-научной базы «Беломорская» (Санкт-Петербург, 2018)

- Беломорская студенческая научная сессия — 2019 (Санкт-Петербург, 2019)
- Отчетная сессия ЗИН РАН (Санкт-Петербург, 2019)
- Беломорская студенческая научная сессия — 2020 (Санкт-Петербург, 2020)

Публикации

Основные положения диссертации изложены в 5 печатных работах, из них в изданиях, рекомендованных ВАК РФ – 3, включая 3 в журналах индексируемых Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Основная часть работы изложена на 120 страницах и содержит 41 рисунок. Список литературы включает 89 наименований, из которых 4 на русском языке и 85 на других языках.

Благодарности

В первую очередь хочу поблагодарить моего научного руководителя К.В. Галактионова за помощь в работе и руководство при выполнении диссертации. Отдельную благодарность хотелось бы выразить А.А. Добровольскому за неоценимый вклад как в эту диссертацию, так и в развитие направления изучения корнеголовых ракообразных. Так же я хочу поблагодарить Д.Ю. Крупенко за помощь в редактировании текста, С.А. Илюткина, А.Д. Лянгузову, Н.Е. Лапшина и Н.А. Арбузову за помощь и активное участие в изучении корнеголовых ракообразных. Отдельную благодарность хотелось бы выразить И.И. Адамейко (медицинский университет Вены) за помощь в проведении иммуногистохимических окрашиваний, Йенсу Хёгу Jens Нюег (университет Копенгагена) и Хенрику Гленнеру Henrik Glenner (университет Бергена) за ценные комментарии. Кроме того, хотелось бы выразить благодарность всем сотрудникам лаборатории по изучению паразитических червей и протистов ЗИН РАН. Исследование выполнено при поддержке сотрудников ЦКП ЗИН РАН «Таксон» (<http://www.ckp-rf.ru/ckp/3038/>), ресурсных центров СПбГУ «Микроскопии и микроанализа» и «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Работа выполнена в рамках тем государственных заданий № АААА-А17-117030310322-3 и АААА-А19-119020690109-2 в лаборатории по изучению паразитических червей и протистов ЗИН РАН. Работа также поддержана грантами РФФИ №18-34-00727, №20-04-00097 и РФФИ № 18-14-00170.

Основное содержание работы

Глава 1 Обзор литературы

В главе приводятся литературные сведения о морфологии, жизненных циклах, филогении и особенностях паразито-хозяйинных отношений представителей таксона корнеголовых ракообразных — Rhizosephala. При этом особое внимание уделено анализу литературы, касающейся тканевой организации и ультраструктуры интерны.

Глава 2 Материал и методика

Объектами исследования послужили следующие виды корнеголовых ракообразных: *Peltogaster paguri* (Rathke, 1842) (сем. Peltogastridae), паразитирующие на раках-отшельниках *Pagurus pubescens* (Krøyer, 1838); *Peltogasterella grasilis* (Boschma, 1927) (сем. Peltogastrillidae), паразитирующие на раках-отшельниках *Pagurus ochotensis* (Brandt, 1851) и *Pagurus pectinatus* (Stimpson, 1858); *Polyascus polygenea* (Lützen & Takahashi, 1997) (сем. Polyascidae), паразитирующие на крабах *Hemigrapsus sanguineus* (De Haan, 1835); *Sacculina pilosella* (Van Kampen & Boschma, 1925) (сем. Sacculinidae), паразитирующие на крабах *Pugettia quadridens* (De Haan, 1839); *Lernaeodiscus* sp., паразитирующие на крабоидах *Pachycheles stevensii* (Stimpson, 1858).

Основные методы исследования. Для изучения морфологии интерны корнеголовых ракообразных использовали ряд стандартных методик, адаптированных к объектам исследования. Собранные хозяева были вскрыты в морской воде. На вскрытиях производили прижизненные наблюдения за паразитами и исследовали их общую морфологию. Затем паразитов фиксировали для дальнейшей обработки. Для исследования тканевой организации были использованы методики гистологической окраски парафиновых срезов с помощью кислого гематоксилина Эрлиха, железного гематоксилина Гейденгайна, полихромного красителя Маллори, бромфенолового синего и азур-эозина. Полутонкие срезы были окрашены красителем Ричардсона. Для визуализации элементов мышечной и нервной систем применяли метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии Leica TCS SP5 (CLSM) в сочетании с иммуногистохимическим окрашиванием антителами против серотонина, FMRF-амида и α -тубулина, фаллоидин с флюоресцентной меткой и ядерный краситель Hoechst/DAPI. Для изучения ультраструктуры клеток паразита выполнены фиксации в 2,5% глутаральдегиде с постфиксацией 4% OsO₄ и с последующим обезвоживанием в спиртах возрастающей концентрации и заливка в смолу Epon 812. Ультратонкие срезы толщиной 60–80 нм изготавливали на ультратоме Leica UC7 и изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа Jeol 1400 (TEM). Поверхность интерны паразита и ткани, оплетающие столоны, исследованы с применением сканирующего

электронного микроскопа FEI Quanta 250 (SEM). Предварительно образцы высушивали в критической точке с помощью Hitachi critical point dryer НСР-2 и напыляли платиной на Giko IB-5 Ion coater.

Глава 3 Результаты и обсуждение

3.1 Региональная дифференциация тканей интерны *Peltogaster paguri*

3.1.1 Результаты

В этом разделе приводятся результаты исследования тканевой организации и ультраструктуры столонов в различных участках интерны *Peltogaster paguri*. На основании вскрытий зараженных хозяев построена обобщенная схема тела *P. paguri* (Рис. 1).

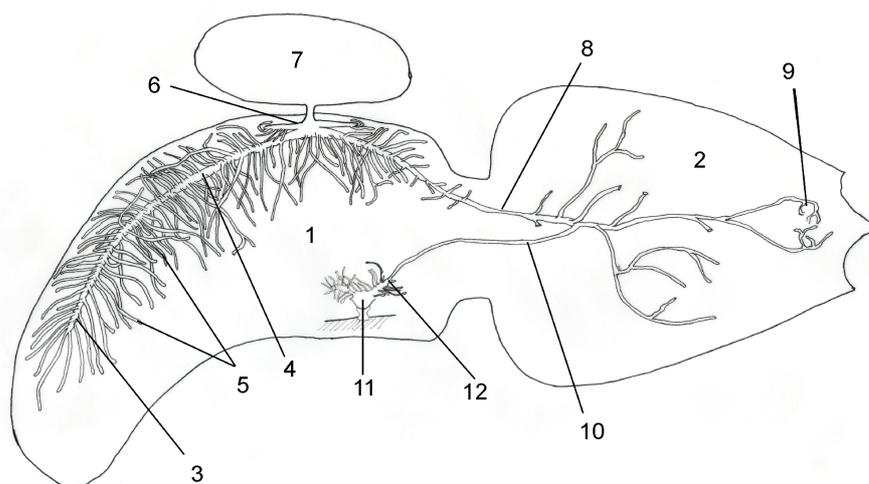


Рис. 1. Обобщенная схема организации тела *Peltogaster paguri*.

1 — абдомен хозяина, 2 — торакс хозяина, 3 — задний дистальный участок главного столона, 4 — участок главного столона, приближенный к экстерне, 5 — периферические столоны, 6 — якорный диск, 7 — экстерна, 8 — главный столон в гнатотораксе, 9 — ветви главного столона, оплетающие надглоточный ганглий хозяина, 10 — отходящий от главного столона возвратный столон, на котором формируется почка новой экстерны, 11 — почка новой экстерны, 12 — вторичный «главный столон».

В ходе работы выделено несколько зон интерны, различающихся между собой по тканевой организации и ультраструктуре. Однако эти зоны не имеют четких границ и плавно переходят друг в друга.

Первая выделенная нами зона включает в себя периферические столоны абдомена и дистальный конец главного столона, лишенный мышц. По-видимому, главная функция этого участка интерны — трофическая.

Вторая зона интерны — это центральный участок главного столона. Здесь происходит образование стебелька с якорным диском и самой экстерны. Правда, на этом же участке, включая и базальную поверхность якорного диска, формируется большое количество периферических столонов, явно разного возраста. Именно здесь чаще всего можно обнаружить столоны с фолликулами — особыми вздутыми структурами на концах столонов. Образующиеся здесь периферические столоны, по сути, должны относиться к первой функциональной зоне, ибо они сохраняет присущее ей строение и трофическую функцию.

Комплекс экстерны, включающий в себя несколько компартментов, составляет третью функциональную зону. Прежде всего, это формирующийся на поверхности центральной части столона якорный диск. Сам якорный диск совмещает и трофическую, и, главное, якорную функцию. Трофика обеспечивается за счет периферических столонов, растущих на якорном диске, а функция прикрепления — за счет мышечного слоя и мощного слоя кутикулы.

Особое место среди компартментов тела рака *Peltogaster paguri* занимает обнаруженный нами возвратный стolon. «Репродуктивная» функция (по терминологии Shukalyuk et al., 2001) этой части тела паразита не вызывает сомнений. На конце возвратного столона формируется почка, из которой в дальнейшем разовьется весь комплекс новой экстерны. Некоторые детали этого комплекса хорошо видны на самых ранних этапах развития почки: начало образования якорного диска, формирование на нем периферических столонов, выделение слоя плотной кутикулы. Таким образом, формируется новый модуль организма, состоящий из главного столона с периферическими выростами и комплекса органов, ассоциированных с экстерной (сама экстерна, стебелек и якорный диск).

3.1.2 Обсуждение

Исходя из полученных результатов, тело представителей вида *Peltogaster paguri* обладает выраженной региональной дифференциацией тканей, гораздо более высокой, чем предполагалось ранее. Выявленные зоны интерны заметно отличаются друг от друга по тканевой организации и ультраструктуре. Скорее всего, разное строение указывает и на разную функциональную нагрузку этих участков интерны.

Ранее считалось, что представители вида *Peltogaster paguri* — унитарные организмы и никогда не образуют несколько экстерн на одной интерне (что характерно для видов некоторых других семейств, таких как *Peltogasterellidae*). Однако обнаружение почки новой экстерны, которая соединена с основной частью интерны, указывает на то, что представители вида *Peltogaster paguri* способны к проявлению черт модульной организации. Данный феномен встречается не очень часто, но все же имеет место быть.

3.2 Мышечные системы интерны

3.2.1 Результаты

В ходе проведенного исследования обнаружены и описаны мышечные системы в интерне у представителей двух семейств корнеголовых ракообразных: Peltogastridae (*Peltogaster paguri*) и Sacculinidae (*Polyascus polygenea* и *Sacculina pilosella*). В то же время у вида из третьего семейства Lernaediscidae (*Lernaediscus* sp.) в столонах интерны мышечные элементы отсутствуют.

Мышечные системы в интерне корнеголовых ракообразных выявлены впервые. До проведения настоящего исследования в литературе отсутствовали какие-либо описания мышечных систем интерны у представителей этой группы животных.

У представителя сем. Peltogastridae — вида *Peltogaster paguri* — мышечная система имеет вид однонаправленной правозакрученной спирали, расположенной вдоль главного столона (Рис. 2). Большинство крупных пучков мышечных волокон располагаются под углом к продольной оси столона. Однако есть и более тонкие волокна, которые образуют анастомозы между крупными пучками. Ответвления от спиральных пучков мышечных волокон могут заходить в проксимальные участки периферических столонов. Таким образом, спиральная мышечная система оплетает центральный канал главного столона (Рис. 2, 3).

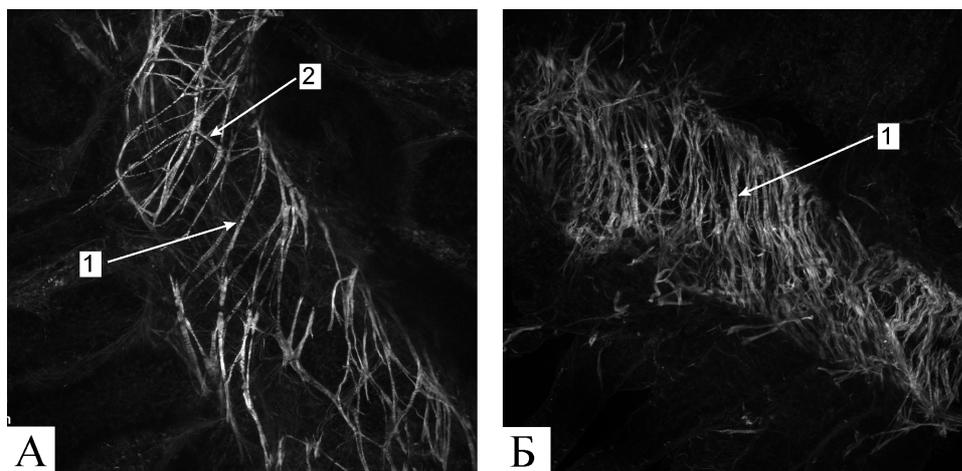


Рис. 2. Спиральная мышечная система в стенке главного столона *Peltogaster paguri*. Конфокальная Z-проекция, окрашивание TRITC-меченым фаллоидином. А - дистальная часть главного столона, Б - проксимальная часть главного столона.

1 — крупные спиральные мышечные волокна, 2 — более мелкие анастомозирующие мышечные волокна.

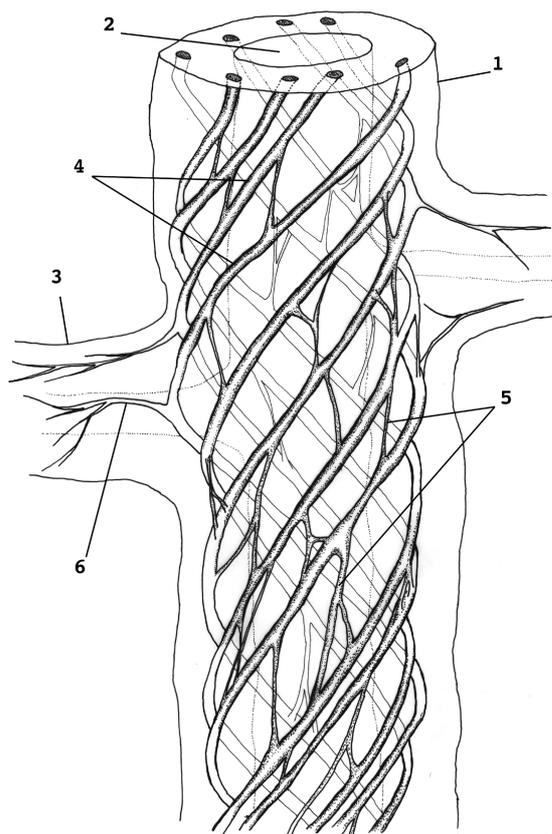


Рис. 3. Реконструкция организации мышечной системы главного столона, выполненная на основе анализа изображений (CLSM).

- 1 — главный стolon
- 2 — полость канала главного столона,
- 3 — периферический стolon,
- 4 — крупные спиральные мышечные волокна,
- 5 — более мелкие мышечные волокна,
- 6 — мышцы, заходящие в проксимальные участки периферических столонов.

Мышечные элементы также были обнаружены в столонах двух представителей семейства Sacculinidae (*Polyascus polygenea* и *Sacculina pilosella*). Однако мышечная система у этих видов по своей организации принципиально отличается от описанной выше для представителей сем. Peltogastridae. В стенке каждого из обследованных столонов *P. polygenea* располагаются множественные звездчатые мышечные элементы. Каждый из них состоит из нескольких сократимых поперечнополосатых волокон, ориентированных в разных направлениях. Отдельные звездчатые мышечные элементы соединены с соседними тонкими волокнами. Таким образом получается, что все мышечные элементы образуют единую мышечную сеть, оплетающую центральный канал столонов (Рис. 4).

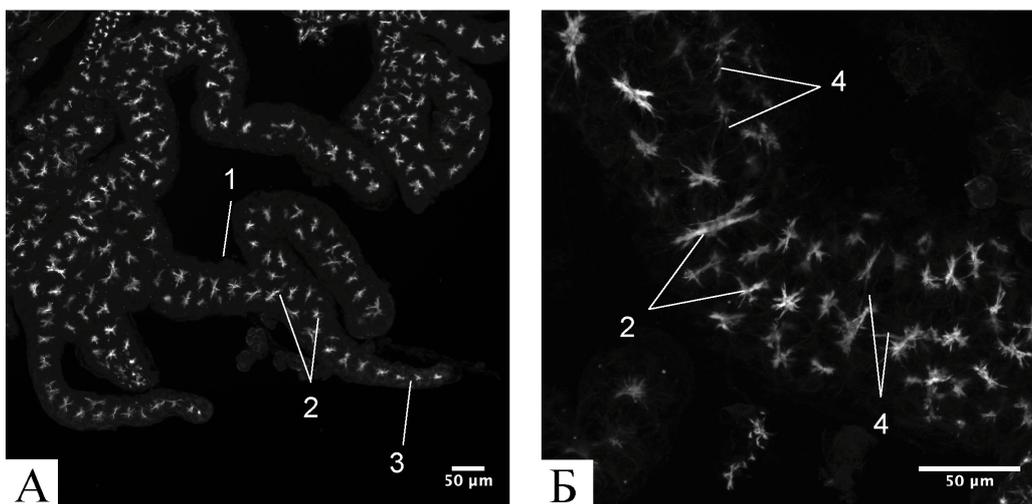


Рис. 4. Мышечные элементы в столонах *Polyascus polygenea* (А, Б). Конфокальная Z-проекция, окрашивание TRITC-меченым фаллоидином.

1 — стolon, 2 — звездчатые мышечные элементы, 3 — стolon с одним рядом мышечных элементов, 4 — тонкие мышечные волокна, соединяющие отдельные мышечные элементы.

Для родственного вида *Sacculina pilosella* характерно сходное строение мышечной системы в интерне. В каждом из обследованных столонов обнаружены звездчатые мышечные элементы, соединённые тонкими фибриллами в общую сеть.

Также в ходе работы обследованы трофические столоны представителей вида *Laernodiscus* sp. из семейства Laernodiscidae. Однако никаких мышечных элементов в столонах этого вида обнаружить не удалось.

3.2.2 Обсуждение

В данной работе удалось впервые визуализировать и описать мышечную систему интерны трех видов корнеголовых ракообразных, относящихся к двум семействам.

Строение мышечной системы и ее расположение в теле паразита указывает на то, что, скорее всего, она важна для реализации распределительной функции. Интерна корнеголовых раков может достигать значительных размеров. Поскольку паразит обычно разрастается по всему телу хозяина, расстояние от дистальных концов интерны до экстерны соизмеримо с размером хозяина (до десятков сантиметров). Диффузия на таких расстояниях не эффективна, поэтому паразиту необходимо наличие какой-либо распределительной системы. Скорее всего, ее функцию берет на себя полость центрального канала. Сокращение мышц обеспечивает перистальтическое движение столонов и транспорт жидкости в полости центрального канала. Таким образом, питательные вещества, которые попадают в центральный канал столона, перемещаются по интерне и, в итоге, транспортируются и до экстерны.

Нами обнаружено значительное различие в строении мышечных систем у представителей разных семейств (спиральная мышечная лента у представителей сем. *Peltogastridae* и звездчатые мышечные элементы у представителей сем. *Sacculinidae*). Мы предполагаем, что столь значительное различие обусловлено разницей в общей морфологии интерн представителей этих семейств. У вида *Peltogaster paguri* в интерне имеется центральный элемент — главный стolon, где и сконцентрированы мышечные элементы. У видов же *Sacculina pilosella* и *Polyascus polygenea* интерна менее гетерогенна и в ней отсутствуют какие-либо центральные элементы. По-видимому, с этим и связано то, что мышечные элементы встречаются у них в каждом stolone.

Мышечная система взрослых представителей группы *Rhizocephala* интересна и с эволюционно-морфологической точки зрения. Согласно описанию жизненного цикла этих животных (Bresciani, Нюег, 2001), вермигон не наследует никаких органов от циприсовидной личинки, включая и мышечную систему. Таким образом, мышечная система у взрослого животного формируется *de novo* второй раз в пределах одного онтогенеза. По-видимому, эта вторичная мышечная система появилась в ходе эволюции *Rhizocephala* относительно недавно. На это указывает уникальность двух обнаруженных типов строения мышечных систем у представителей двух семейств корнеголовых раков, не имеющих каких-либо аналогов среди *Metazoa*.

Остается открытым вопрос о происхождении вторичной мышечной системы в разных семействах корнеголовых раков. Возможно, эта система сформировалась у предка корнеголовых и, вследствие своей эволюционной «молодости», крайне пластична и «подстраивается» под организацию интерны. В некоторых группах она могла быть вторично утрачена — например, у представителей семейства *Laernodiscidae*. С другой стороны, возможно, что мышечная система в разных группах корнеголовых ракообразных возникла независимо.

Так как в ходе исследования не удалось обнаружить никаких элементов нервной системы паразита, то вопрос об иннервации мышечной системы остается открытым.

3.3 Взаимодействие с нервной системой хозяина

3.3.1 Результаты

В ходе исследования обнаружено, что некоторые stolony корнеголовых ракообразных ассоциированы с участками брюшной нервной цепочки хозяина. Эти stolony прорастают вглубь ганглиев, и их дистальные участки лежат в толще нервной ткани хозяина. Подобный феномен обнаружен у всех обследованных видов корнеголовых ракообразных, однако детали строения stolonov, проникающих в нервную ткань хозяина, значительно отличаются.

У представителей сем. *Peltogastridae* (*P. paguri* и *P. gracilis*) stolony, ассоциированные с нервной цепочкой хозяина, заканчиваются бокаловидными органами, которые располагаются в толще нервной ткани хозяина. По своему гистологическому строению и ультраструктуре

бокаловидные органы значительно отличаются от обычных трофических столонов интерны (Рис. 5). Апикальная мембрана эпителиальных клеток бокаловидного органа несет множество плотно уложенных микровиллей, а их цитоплазма богата митохондриями и полями шероховатого ЭПР.

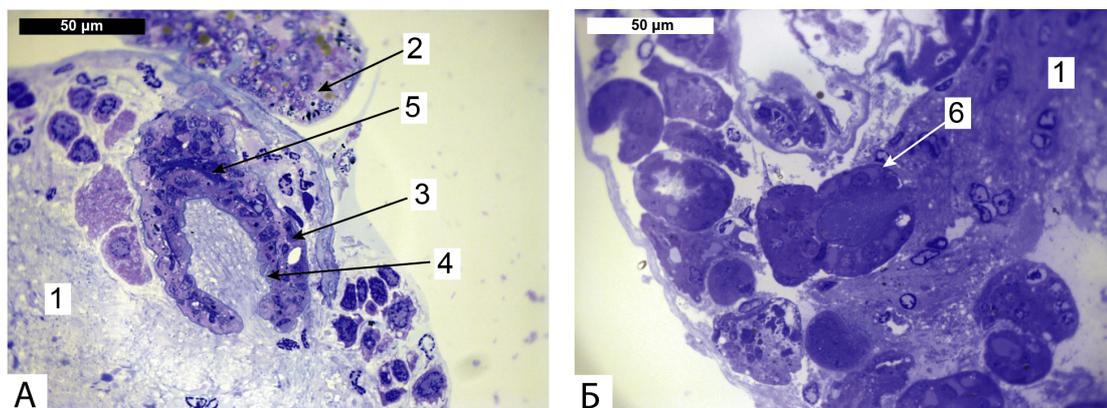


Рис. 5. А — Бокаловидные органы *Peltogaster paguri*, Б — Бокаловидные органы *Peltogasterella gracilis*. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм, окраска красителем по Ричардсону. 1 — ганглий хозяина, 2 — столон, внедряющийся в ткань ганглия, 3 — внешний слой клеток бокаловидного органа, 4 — внутренний слой клеток бокаловидного органа, 5 — слой внеклеточного матрикса, 6 — бокаловидные органы *P. gracilis*.

У представителей вида *Sacculina pilosella* (сем. Sacculinidae) так же были обнаружены бокаловидные органы на концах столонов, ассоциированных с центральной нервной системой хозяина. Однако строение их несколько отличается от строения бокаловидных органов представителей сем. Peltogastridae. Кроме бокаловидных органов в толще ганглиев выявлены тонкие, морфологически не модифицированные столоны. При этом бокаловидные органы располагаются преимущественно по периферии ганглия, в то время как тонкие столоны в основном находятся в центре ганглия (в нейропиле) (Рис. 6А).

Еще один вид из сем. Sacculinidae — *Polyascus polygenea* имеет столоны, ассоциированные с нервной системой хозяина. Каких-либо специализированных органов на концах столонов, наподобие бокаловидных органов, не найдено. Столоны, проникающие в нервы и ганглии хозяина, весьма многочисленны и могут занимать значительный объем нервной ткани (Рис. 6Б). На гистологическом уровне столоны интерны *Polyascus polygenea*, расположенные в толще нервной ткани хозяина, не очень сильно отличаются от обычных трофических столонов. Но на ультраструктурном уровне наблюдаются некоторые отличия — микровыросты кутикулы значительно толще и плотно уложены, субкутикулярное пространство выражено слабее чем в нормальных трофических столонах. Кроме того, выполненное иммуногистохимическое исследование показало, что вблизи столонов паразита в ткани ганглия повышена концентрация серотонина. Также в самих столонах часто встречаются везикулы, которые связываются с антителами к серотонину (Рис. 7А, Б).

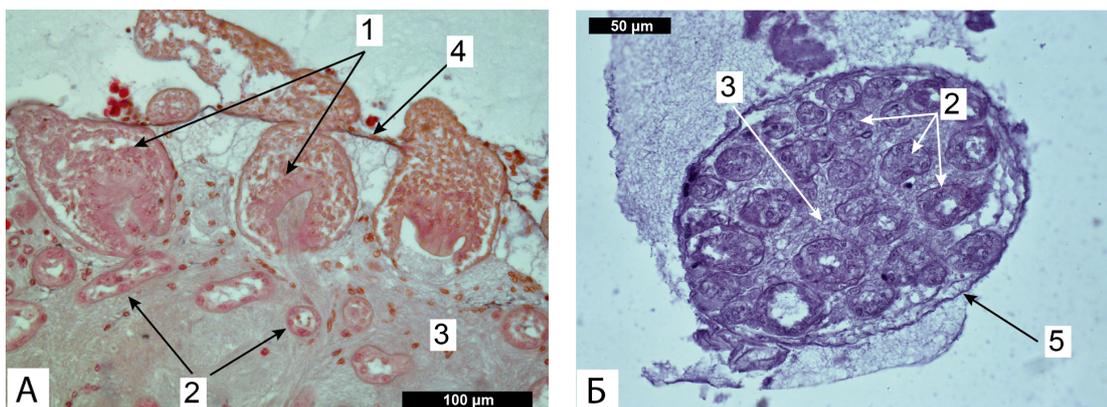


Рис. 6. А — Бокаловидные органы и тонкие столоны *Sacculina pilosella* в ткани ганглия хозяина, Б — Столоны *Polyascus polygenea* внутри нервного ствола хозяина. Гистологические срезы толщиной 5 мкм.

1 — бокаловидные органы, 2 — тонкие не модифицированные столоны, 3 — нервная ткань хозяина, 4 — оболочка ганглия, 5 — нервный ствол хозяина.

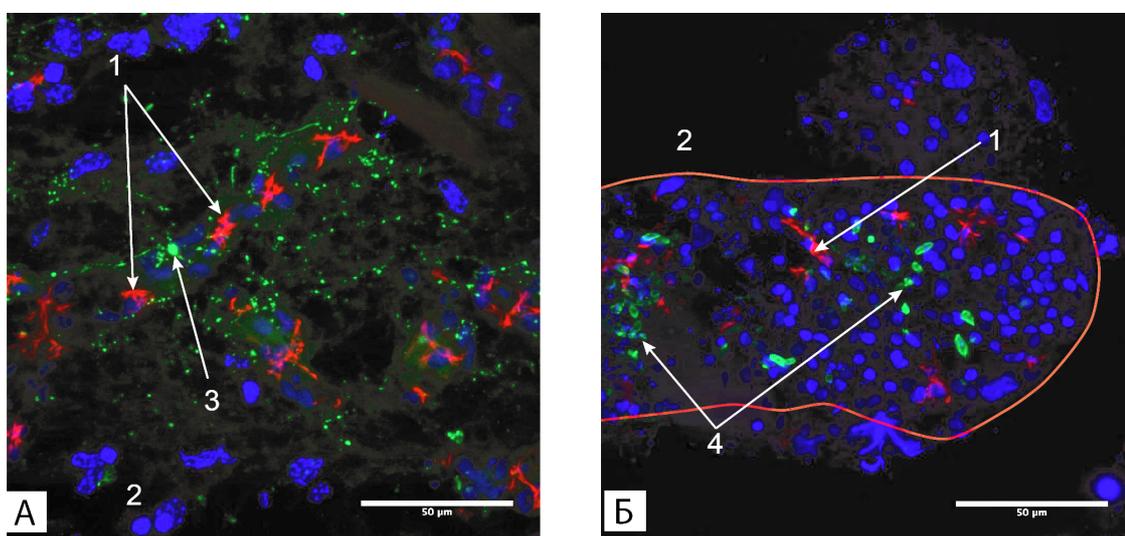


Рис. 7. А, Б — Столоны *Polyascus polygenea* в ткани ганглия хозяина. (На рисунке Б границы столон отмечены красной линией).

Конфокальная Z-проекция криосрезов ганглия, DAPI (синий), 5HT (зеленый), TRITC-меченый фаллоидин (красный).

1 — мышечные волокна внутри столон, 2 — нервная ткань хозяина, 3 — агрегация серотонина вблизи столон, 4 — везикулы с серотонином внутри столон.

Помимо описанного выше контакта у всех рассмотренных видов корнеголовых раков мы обнаружили еще один сайт связи паразита с нервной системой хозяина. Трофические столоны, лежащие в гемоцеле хозяина, оплетены сетью из нейронов хозяина (Рис. 7А). Нервную природу этой ткани подтверждает иммуногистохимическое окрашивание антителами к α -тубулину и различным нейромедиаторам (Рис. 7Б).

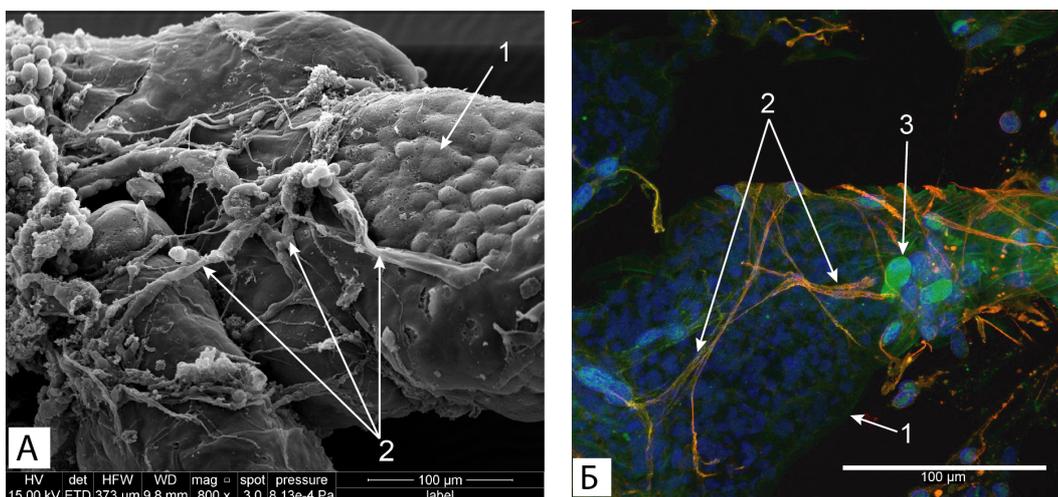


Рис. 7. А — Сканограмма поверхности столонов *Peltogaster paguri* и оплетающие их тяжи ткани хозяина, Б — Нервные волокна хозяина на поверхности столонов *Polyascus polygenea*, Конфокальная Z-проекция, DAPI (синий), 5НТ (зеленый), α -тубулин (красный).

1 — столоны паразита, 2 — отростки нервных клеток хозяина, 3 — тело нейрона хозяина.

3.3.2 Обсуждение

Корнеголовые ракообразные известны своей способностью брать под контроль тело ракообразного-хозяина. Они могут изменять морфологию, метаболизм, гормональный статус, а также и поведение хозяина. Однако до недавнего времени оставалось неизвестным, каким образом и с помощью каких структур происходит это тесное паразит-хозяинное взаимодействие.

В ходе данной работы удалось описать два различных типа структур, вовлеченных в прямое взаимодействие корнеголовых ракообразных и нервной системы хозяев: (1) модифицированные столоны, проникающие в ганглии брюшной нервной цепочки хозяина, и (2) волокна периферической нервной системы хозяина, оплетающие трофические столоны интерны.

У представителей сем. *Peltogastridae* концевые участки столонов, ассоциированных с нервными ганглиями хозяина, преобразованы в специализированные органы бокаловидной формы. Бокаловидные органы были также найдены у вида *Sacculina pilosella*, который филогенетически отстоит довольно далеко от *Peltogaster paguri* и *Peltogasterella gracilis*. Это может служить указанием на то, что наличие таких бокаловидных структур суть признак, общий для всех корнеголовых ракообразных.

Тканевая организация и ультраструктура клеток этих специализированных столонов значительно отличаются от трофических столонов как общей морфологией и тканевой организацией, так и ультраструктурой клеток. Подобные различия позволяют сделать вывод от том, что, скорее всего, эти органы выполняют функции, отличные от функций трофических столонов. Огромные поля ЭПР с вздутыми цистернами указывают на высокую синтетическую активность этой ткани. Большое количество митохондрий и выраженные микровилли на апикальной поверхности клеток указывают, что в этих участках тела паразита происходит

активный транспорт веществ. Можно предположить, что посредством специализированных столон, располагающихся в толще нервной ткани хозяина, паразит может как секретировать различные вещества (предположительно нейромедиаторы и нейрогормоны), так и поглощать их из нервной ткани хозяина.

Интересной находкой также служит обнаружение везикул с серотонином в столонках *Polyascus polygenea*, лежащих в толще нервной ткани хозяина, и повышенного содержания этого же нейромедиатора в самой нервной ткани в непосредственной близости от столон. Серотонин, сам по себе воздействуя на нервную систему, должен снижать агрессивность и повышать прожорливость, что собственно и демонстрируют зараженные хозяева (Bishop, Cannon, 1979; Innocenti et al., 2003; Vazquez-Lopez et al., 2006; Vázquez-López, 2010; Toscano et al., 2014; Larsen et al., 2015; Belgrad, Griffen, 2015; Pérez-Miguel, 2017).

Все приведенные выше факты позволяют предположить, что столонки, ассоциированные с нервными ганглиями хозяина, принимают непосредственное участие в регуляции паразито-хозяинных взаимодействий.

В ходе работы было также обнаружено, что трофические столонки интерны у представителей всех обследованных видов (*Peltogaster paguri*, *Peltogasterella gracilis*, *Sacculina pilosella*, *Polyascus polygenea*) оплетены сетью из тяжёлых тканей хозяина. Иммуногистохимические методы выявили нервную природу этой ткани. Таким образом, обнаружен еще один сайт прямого контакта паразита с нервной системой хозяина (на этот раз — с периферической). Скорее всего, данный контакт также принимает участие во взаимодействии паразита с хозяином. Возможно, функции бокаловидных органов и нервного оплетения трофических столон различаются.

Следует отметить, что подобная реакция нервной системы хозяина на присутствие паразита не типична, и вряд ли можно рассматривать этот феномен как защитную реакцию хозяина. Вероятно, паразит выделяет аналоги нейроростовых факторов и нейротрофинов хозяина и таким образом стимулирует рост нейронов.

Заключение

В проведенном исследовании нам удалось выявить ряд принципиально новых аспектов в морфофункциональной организации корнеголовых раков. Ранее интерна рассматривалась исследователями как однородная структура, выполняющая трофическую функцию. Нами обнаружено, что интерна представителей вида *Peltogaster paguri* устроена гораздо сложнее, чем предполагалось ранее. Она подразделена на несколько функциональных зон, различающихся по своему строению и тканевой организации. Кроме того, выяснено, что представители этого вида потенциально способны к образованию модульного организма. Полученные результаты позволяют по-новому взглянуть на функционирование организма корнеголовых ракообразных.

Обнаружена и описана мышечная система в интерне у нескольких видов корнеголовых ракообразных. В литературе какие-либо данные о строении мышечной системы в интерне отсутствовали. Более того, большинство авторов статей, касающихся морфологии этих животных, вообще игнорировали вопрос о наличии каких-либо сократимых элементов в интерне. Поэтому данное исследование является первой работой с описанием мышечной системы интерны корнеголовых раков.

Мы предполагаем, что мышечная система, обнаруженная в интерне у нескольких видов корнеголовых ракообразных, способствует выполнению распределительной функции. Мышцы обеспечивают перистальтику столонов и тем самым осуществляют транспорт питательных веществ в центральном канале.

Согласно данным о жизненном цикле Rhizosephala, мышечная система не наследуется взрослым организмом от личинки. Таким образом получается, что у этих животных мышечная система возникает дважды в течение одного онтогенеза. И если мышечная система личинки ничем принципиально не отличается от таковой у свободноживущих родственников, то архитектура мышечной системы взрослого организма не имеет каких-либо аналогов среди известных групп Metazoa. Скорее всего, мышечная система взрослого организма сравнительно молодая с эволюционной точки зрения. Это может также объяснить и обнаруженные принципиальные различия в строении мышечной системы интерны у представителей разных семейств Rhizosephala, что указывает на высокую эволюционную пластичность этих структур.

Полученные результаты ставят множество новых вопросов и открывают поле для дальнейших исследований эволюционных тенденций в развитии мышечной системы среди всех представителей корнеголовых ракообразных.

В данном исследовании нам также удалось обнаружить и описать морфологические структуры, участвующие в прямом контакте корнеголовых ракообразных с нервной системой хозяина. Были выявлены как столоны паразита, внедряющиеся в ганглии нервной системы хозяина, так и фрагменты периферической нервной системы хозяина, самостоятельно

оплетающие трофические столоны паразита. Мы предполагаем, что все эти структуры принимают непосредственное участие в сложных паразито-хозяинных взаимодействиях. Полученные результаты открывают возможность для дальнейшего более углубленного изучения механизмов воздействия паразита на хозяина уже с применением молекулярных и биохимических методических подходов.

Выводы

1. Интерна корнеголового рака *Peltogaster paguri* обладает выраженной региональной дифференциацией тканей. В ней выделяется несколько зон, различающихся по строению и функциональной нагрузке.
2. Впервые показано, что некоторые корнеголовые раки обладают развитой мышечной системой в интерне, которая, по-видимому, обеспечивает перистальтические сокращения столон и тем самым способствует распределению питательных веществ по телу паразита.
3. Мышечная система у разных представителей корнеголовых ракообразных устроена принципиально различно, что зависит от общей морфологии интерны:
 - 3.1. *Peltogaster paguri* (сем. Peltogastridae) имеет однонаправленную спиральную мышечную систему, располагающуюся в стенке главного столона. Концентрация мышечных элементов в главном столоне связана с тем, что он является центральным отделом интерны и в нем собирается жидкость из каналов периферических столон.
 - 3.2. Столоны интерны *Sacculina pilosella* и *Polyascus polygenea* (сем. Sacculinidae) несут звездчатые мышечные элементы, соединенные между собой тонкими сократимыми фибриллами. В интерне этих видов отсутствуют какие-либо центральные элементы (такие, как главный стolon у *P. paguri*), поэтому мышечные элементы располагаются в стенке каждого столона.
4. Впервые обнаружено два сайта прямого контакта корнеголовых ракообразных с нервной системой хозяина:
 - 4.1. Все обследованные виды корнеголовых ракообразных имеют специализированные столоны, ассоциированные с ганглиями нервной системы хозяина. Они представлены бокаловидными органами на концевых участках столон в толще (у представителей сем. Peltogastridae – *Peltogastrella grasilis* и *Peltogaster paguri*) или по периферии (у представителей сем. Sacculinidae – *Sacculina pilosella*) нервного ганглия хозяина. У *S. pilosella*, помимо того, выявлены тонкие морфологически не модифицированные столоны в нейропиле ганглия. У *Polyascus polygenea* (сем. Sacculinidae) такие столоны во множестве пронизывают всю толщу ганглия хозяина, а бокаловидные органы отсутствуют.

4.2. Трофические столоны всех обследованных видов корнеголовых ракообразных оплетены сетью из тяжелой нервной ткани хозяина. Некоторые из этих нейронов окрашивались антителами против серотонина и FMRF-амида, что свидетельствует о их функциональной активности и указывает на возможное участие в паразито-хозяинных взаимодействиях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК:

1. **Miroliubov, A.A.** Muscular system in interna of *Peltogaster paguri* (Rhizocephala: Peltogastridae) / **A.A. Miroliubov** // *Arthropod structure & development*. – 2017a. – Т. 46, №. 2. – С. 230–235.
2. **Miroliubov, A.A.** Muscular system in the interna of *Polyascus polygenea* and *Sacculina pilosella* (Cirripedia: Rhizocephala: Sacculinidae) / **A.A. Miroliubov**, I.E. Borisenko, M.A. Nesterenko, O.M. Korn, A.D. Lianguzova, S.A. Ilyutkin, N.E. Lapshin, A.A. Dobrovolskij // *Invertebrate Zoology*. – 2019. – Т. 16, №. 1. – С. 48–56.
3. **Miroliubov, A.A.** Specialized structures on the border between rhizocephalan parasites and their host's nervous system reveal potential sites for host-parasite interactions / **A.A. Miroliubov**, I.E. Borisenko, M.A. Nesterenko, A.D. Lianguzova, S.A. Ilyutkin, N.E. Lapshin, A.A. Dobrovolskij // *Scientific Reports*. – 2020. – Т. 10, №. 1. – С. 1–11.

Публикации в других изданиях:

4. **Миролюбов, А.А.** Особенности жизненного цикла *Peltogaster paguri* (Rhizocephala: Peltogastridae) / **А.А. Миролюбов** // *Современные проблемы теоретической и морской паразитологии*. – 2016. сб. статей. – Севастополь, 2016. – С. 99–101.
5. **Miroliubov, A.A.** Muscular system and some other aspects of internal organisation of Rhizocephala / **A.A. Miroliubov**, J.T. Høeg, A.A. Dobrovolskij // *4th International congress on Invertebrate Morphology: сб. статей*. – Москва, 2017b. – С. 185.
6. **Миролюбов, А.А.** Мышечная система интерны паразитического ракообразного *Peltogaster paguri* (Cirripedia: Rhizocephala: Kentrogonida) // *Современные проблемы эволюционной морфологии животных. Материалы школы для молодых специалистов и студентов с международным участием к 110-летию со дня рождения академика А. В. Иванова (29 сентября–1 октября 2016 г.)*. СПб: ЗИН РАН. 2016. – С. 80.

7. **Миролюбов, А.А.**, Илюткин, С.А., Добровольский, А.А. Мышечная система двух представителей корнеголовых ракообразных (Rhizocephala) // I Студенческая научная сессия УНБ «Беломорская» Тезисы докладов. СПбГУ. – С. 32.
8. **Миролюбов, А.А.**, Лянгузова, А.Д., Илюткин, С.А., Нестеренко, М.А., Добровольский, А.А. Примеры прямого взаимодействия паразитических ракообразных (Cirripedia: Rhizocephala) с нервной системой хозяина // Материалы VI Съезда Паразитологического общества: Международная конференция: г. Санкт-Петербург, 15–19 октября 2018. – С. 161.
9. **Миролюбов, А. А.**, Илюткин, С. А., Лянгузова, А. Д., Добровольский, А. А. Особенности взаимодействия паразитических ракообразных *Peltogaster paguri* и *Peltogastrella gracilis* (Cirripedia: Rhizocephala) с центральной нервной системой хозяина // 2-я студенческая научная сессия УНБ «Беломорская»: тезисы докладов. Санкт-Петербургский государственный университет, 2018. – С. 96.
10. **Миролюбов, А.А.**, Лянгузова, А.Д., Илюткин, С.А., Нестеренко, М.А., Добровольский, А.А. Прямой контакт паразита с нервной системой хозяина как один из аспектов паразито-хозяинного взаимодействия на примере корнеголовых ракообразных (Cirripedia: Rhizocephala) и их хозяев (Crustacea: Decapoda) / А.А. Миролюбов, А.Д. Лянгузова, С.А. Илюткин, М.А. Нестеренко, А.А. Добровольский // Зоология беспозвоночных – новый век: материалы конференции, посвященной 160-летию Кафедры зоологии беспозвоночных Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. – Москва, 2018. – С. 86.