

Смирнов Петр Александрович

Морфофункциональные последствия перехода мерицидиев к пассивной
стратегии заражения первого промежуточного хозяина

1.5.17. Паразитология (биологические науки)

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, **Галактионов Кирилл Владимирович**

Официальные оппоненты:

Бисерова Наталья Михайловна доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Токмакова Арина Сергеевна кандидат биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук

Защита состоится 2023 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета 24.1.026.01, 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 Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук: <http://www.zin.ru/boards/24.1.026.01/theses.html>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ахметова Лилия Агдасовна

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Жизненный цикл паразитических плоских червей дигеней (Trematoda, Digenea) протекает как закономерное чередование нескольких партеногенетических поколений, развивающихся в первом промежуточном хозяине – моллюске, и гермафродитного поколения, половозрелые стадии (мариты) которого паразитируют в позвоночных животных – дефинитивных хозяевах (Гинецинская, 1968). Этот сложный жизненный цикл исследован неравномерно (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). Детальное описание всех его стадий проведено лишь для немногих «модельных» представителей, имеющих медицинское или ветеринарное значение: виды родов *Schistosoma*, *Fasciola* и *Echinostoma*. В наибольшей степени современное представление о разнообразии дигеней основано на знаниях о маритах. Довольно хорошо исследованной стадией можно считать и личинку мариты – церкарию, строение которой с той или иной степенью детализации известно практически для всех крупных семейств дигеней. Существенно хуже изучены стадии партеногенетических поколений (мирацидии, спороцисты, редики).

Первые системы Digenea была построены исключительно на основе морфологических признаков марит. По мере исследования других стадий жизненного цикла этих паразитов появлялись другие системы, учитывающие признаки церкарий (Lühe, 1909; La Rue, 1957) и даже партенит (Odening, 1974; Brooks et al., 1985). Между построенными классификациями накапливались противоречия, которые не были в полной мере разрешены и с применением молекулярных данных (Olson et al., 2003). На сегодняшний день отсутствует система дигеней, которая согласовывалась бы с представлениями о направлениях эволюции их жизненных циклов и морфофункциональной специализации. Это во многом обусловлено сильной «асимметрией» в аккумулированных данных по разным стадиям жизненных циклов этих паразитов и путях реализации их жизненных циклов.

Самыми малоисследованными стадиями жизненного цикла Digenea, безусловно, являются мирацидии и материнские спороцисты. Для многих крупных таксонов эти стадии, если и описаны, то очень поверхностно, а для некоторых – отсутствуют хоть какие-либо данные по их строению. Тем не менее, даже имеющихся сведений достаточно, чтобы дать следующую оценку: мирацидии и материнские спороцисты — это весьма разнообразные организмы, прошедшие через долгую историю взаимодействия с первым промежуточным хозяином. Безусловно, в их строении и биологии скрыт важный филогенетический сигнал (Dobrovolskij, 1965; Добровольский и др., 1983; Семенов, 1991), который должен быть учтен при построении непротиворечивой системы Digenea, основанной на комбинации молекулярных и морфологических данных.

Современные представления о мирацидиях и материнских спороцистах базируются в большей степени на сведениях по личинкам, использующим активную стратегию заражения первого промежуточного хозяина. Такие личинки вылупляются из яйца при попадании в воду и активно ищут специфического хозяина – брюхоногого моллюска определенного вида. Достигая моллюска, мирацидии внедряются в его ткани через покровы. Многочисленные описания «активных» мирацидиев сформировали представление об этой стадии, как о весьма однотипно устроенных организмах (Smith, Halton, 1983). Однако, чуть ли не во всех крупных группах Digenea у ряда или у всех составляющих их таксонов более низкого ранга произошел переход мирацидиев к пассивной стратегии заражения первого промежуточного хозяина (Cribb et al., 2003). «Пассивные» мирацидии не выходят из яйца в воду, а вылупляются только при случайном проглатывании яйца моллюском. Попадая таким образом в хозяина, личинки внедряются в его кишечный эпителий. Переход к такой стратегии заражения повлек за собой существенные морфологические преобразования (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003).

«Пассивные» мирацидии изучены несопоставимо хуже «активных», но даже имеющих на сегодняшний день данных хватает, чтобы утверждать: именно в «пассивных» формах кроется большая часть морфологического разнообразия этой стадии жизненного цикла дигеней. Детальное исследование строения "пассивных" мирацидиев долгое время сдерживалось отсутствием адекватной методики подготовки для электронной микроскопии этих микроскопических объектов, заключенных в химически непроницаемую и механически прочную скорлупку яйца. Преодолеть эту трудность удалось только с разработкой метода криофиксации с последующим криозамещением (Jones et al., 2008), который использован при выполнении настоящего исследования. В качестве его объектов выбраны мирацидии дигеней, принадлежащих разным филогенетическим линиям. Эти личинки, согласно имеющимся светооптическим данным, контрастно различаются по своему строению. Исследование их ультраструктурной организации представляет несомненный научный интерес: результаты этого исследования позволяют провести корректный сравнительный анализ «пассивных» и «активных» личинок и наметить основные тенденции эволюции мирацидиев после перехода к пассивной стратегии заражения.

Цель и задачи работы

Целью проведенного исследования стало определение направлений эволюции морфофункциональной организации мирацидиев после перехода к пассивной стратегии заражения первого промежуточного хозяина на примере представителей семейств *Vucephalidae*, *Fellodistomidae*, *Gymnophallidae*, *Hemiuridae*, *Derogenidae*, *Heterophyidae* и *Notocotylidae*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие основные задачи:

1. Выполнить реконструкцию ультраструктурной организации «пассивных» мирацидиев представителей семейств *Gymnophallidae* (*Parvatrema affine*), *Vucephalidae* (*Prosorhynchus squamatus*), *Fellodistomidae* (*Steringophorus furciger*), *Derogenidae* (*Derogenes varicus*), *Hemiuridae* (*Bunocotyle progenetica*), *Heterophyidae* (*Cryptocotyle lingua*) и *Notocotylidae* (*Paramonostomum alveatum*).
2. Сравнить полученные схемы строения «пассивных» мирацидиев с имеющимися в литературе данными по «активным» формам и выявить на этой основе морфофункциональные последствия смены стратегии заражения первого промежуточного хозяина.
3. Определить общие тенденции эволюции морфофункциональной организации «пассивных» мирацидиев, реализующиеся независимо в разных филогенетических ветвях *Digenea*.
4. Определить частные тенденции эволюции мирацидиев в рамках таксонов *Vucephalata*, *Hemiurata* и *Opisthorchiata*.
5. Провести экспериментальное заражение первых промежуточных хозяев мирацидиями *Bunocotyle progenetica* (*Hemiuridae*) и *Paramonostomum alveatum* (*Notocotylidae*) и определить характер метаморфоза этих личинок и ранних этапов формирования материнских спорцист.

Научная новизна исследования

Впервые для семи видов дигеней произведены детальные ультраструктурные реконструкции мирацидиев с пассивной стратегией заражения, включающие данные по всем клеточным системам этих организмов. Показано, что изменения, связанные со сменой стратегии заражения, фактически «разрушают» план строения, описанный для «активных» мирацидиев. Впервые прослежены тенденции преобразования покровов и мускулатуры, определен уровень редукции нервной и

выделительной систем и состав генеративного материала у мирацидиев представителей крупных таксонов Digenea.

Проведенное исследование – первое, в котором предпринята попытка комплексного морфологического сравнения «активных» и «пассивных» мирацидиев на примере относительно большого числа видов.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты данного исследования могут быть использованы в двух направлениях паразитологии и зоологии.

Первое применение – это уточнение филогенетических связей в пределах Digenea. Согласно распространенному мнению, мирацидий – одна из древнейших стадий жизненного цикла, поэтому, безусловно, его морфология несет важный филогенетический сигнал (Добровольский и др., 1983; Семенов, 1991). Однако фактически полное отсутствие данных по «пассивным» формам не дает возможности учитывать эту стадию при филогенетических построениях. «Актуальная» на данный момент схема эволюции Digenea, построенная по молекулярным данным, была опубликована довольно давно (Olson et al., 2003) и, несомненно, нуждается в уточнении. Ввиду того, что тенденции систематики Digenea ведут к интегративному подходу (Blasco-Costa et al., 2016; Faltýnková et al., 2022), при котором учитываются все типы признаков (морфологические, молекулярные, экологические), исследование морфологии мирацидиев стало важной задачей.

Второе значимое применение результатов данного исследования – использование их биологами, которые занимаются проблемами миниатюризации и редукции. В этом контексте «пассивные» личинки, будучи одними из мельчайших организмов среди Metazoa, являются очень интересным примером экстремального морфологического упрощения. Этот пример уникален тем, что мы точно знаем, что именно («активные» мирацидии) и по какой причине (смена стратегии заражения) подверглось этой редукции. Судя по имеющимся и полученным в ходе выполнения настоящего исследования данным, при переходе мирацидиев к пассивной стратегии заражения формируются новые «планы строения». Таким образом, «пассивных» мирацидиев можно считать важной моделью изучения возникновения новых форм у Metazoa.

Помимо перечисленных научных применений, результаты этого исследования несут практическую значимость: полученные данные могут быть использованы (и уже используются) в курсах лекций паразитологической и зоологической направленности.

Методическая основа исследования

Материалом для данной работы послужили мирацидии дигеней, половозрелые особи которых паразитируют в рыбах и птицах Белого моря. Сбор материала осуществлялся в районе острова Средний (губа Чупа) в соответствии со всеми нормами: птицы были получены от местных охотников, отлов рыбы осуществлялся без использования сетей. Полученные в результате паразитологических вскрытий дигенеи были определены до вида с использованием имеющихся определителей. Отобранный материал был транспортирован в холодильном боксе в Санкт-Петербург, где производилась основная часть работы. Основные методы исследования: световая микроскопия и трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия (см. главу «Материал и методика»).

Положения, выносимые на защиту

1. Переход мирацидиев от активной стратегии заражения первого промежуточного хозяина к пассивной влечет за собой кардинальные изменения их строения. Множественные переходы привели к формированию большого разнообразия устройства «пассивных» личинок.

2. Для мирацидиев *Vucephalata* характерно отсутствие единого плана строения. Несмотря на это, в строении мирацидиев представителей семейств *Vucephalidae*, *Gymnophallidae* и *Fellodistomidae* отчетливо проявляются общие черты, определяемые их переходом к пассивной стратегии заражения первого промежуточного хозяина: уменьшение количества ресничных эпителиальных клеток, редукция сложной нервной системы, продольных мышц и протонефридиев, сдерживание развития зародышевого материала и реорганизация аппарата проникновения.
3. Одной из важнейших тенденций эволюции морфофункциональной организации мирацидиев *Hemiurata* следует считать замещение ресничек шипами на поверхности эпителиальных пластинок. Эпителиальные пластинки этих личинок фактически стали частью аппарата проникновения в кишечный эпителий моллюска-хозяина.
4. Мирацидиям *Opisthorchiata* присущ высокий уровень консервативности строения в пределах таксона.
5. Мирацидии *Notocotyliidae* демонстрируют экстремальный уровень редукции соматических элементов, что стало возможным благодаря развитию особого «внешнего» аппарата проникновения – оперкулярного тяжа, формируемого желточной мембраной сложного яйца.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты, представленные в данной диссертации, получены с использованием классических методов морфологического исследования (просвечивающая электронная микроскопия, световая микроскопия). В ходе работы было проанализировано большое число микрофотографий серий срезов мирацидиев, из которых в диссертации приводится лишь малая часть. Особенность объектов исследования (непроницаемость скорлупки яйца, в которую заключены мирацидии) потребовала применения современной методики пробоподготовки – криофиксации под высоким давлением. Данная методика уже неоднократно применялась для подобных объектов (Jones et al., 2008; Swideski et al., 2010, 2013), поэтому обоснованность использования этого метода для выполнения поставленных задач не вызывает сомнений. Полученные результаты прошли через независимое рецензирование при публикации в научных журналах, что и подтвердило их достоверность.

Основные положения диссертации изложены в четырех печатных работах в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, включая три в журналах индексируемых Web of Science и Scopus и одну – RSCI.

Основные положения диссертации были представлены на конференциях:

- 63-ие Догелевские чтения, Санкт-Петербург, 2018
- Всероссийская конференция с международным участием "Современная паразитология: основные тренды и вызовы (VI Съезд Паразитологического общества)", Санкт-Петербург, 2018
- International Congress on Invertebrate Morphology 5, Вена, Австрия, 2022

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов и списка литературы. Основная часть работы изложена на 125 страницах и содержит 45 рисунков. Список литературы включает 109 наименований, из которых 10 на русском языке и 99 на других языках.

Благодарности

Я выражаю глубокую благодарность А.А. Добровольскому, который вдохновил меня на проведение данной работы и принимал активное участие в ее реализации на ранних этапах. Также благодарю своего научного руководителя К.В. Галактионова за всестороннюю поддержку,

заинтересованность и множество комментариев к рукописи. В сборе материала, который лег в основу исследования, принимали участие Крупенко Д.Ю., Кремнев Г.А., Багров С.В., Николаев К.Е., чем существенно помогли его реализации.

Исследование проводилось с использованием оборудования ЦКП ЗИН РАН «Таксон» (<http://www.ckp-rf.ru/ckp/3038/>), а также ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» (<http://biomed.spbu.ru/>).

Часть работы выполнена в рамках тем государственных заданий 1021051402849-1 и АААА-А19-119020690109-2 в лаборатории по изучению паразитических червей и протистов ЗИН РАН.

Часть работы выполнена в рамках гранта РФФИ №20-34-90113-Аспиранты.

Основное содержание работы

Глава 1. Обзор литературы

В главе приводятся сведения об истории исследования мирацидиев, рассматривается морфология мирацидиев с активной стратегией заражения на примере хорошо изученных представителей (*Fasciola*, *Schistosoma*, *Echinostoma*). Описываются покровы, мускулатура, аппарат проникновения, выделительная и нервная системы и генеративный материал личинок. Также здесь приводится обзор имеющихся в литературе данных по строению «пассивных» мирацидиев представителей подотрядов *Vucephalata*, *Brachylaimata*, *Hemiurata*, *Opisthorchiata*, *Plagiorchiata* и *Pronocephalata*.

Глава 2. Материал и методика

Ниже представлена таблица, в которой перечислены исследованные виды, семейства, к которым они принадлежат, и их окончательные хозяева.

Вид	Семейство	Окончательный хозяин
<i>Proisorhynchus squamatus</i>	Vucephalidae	<i>Myoxocephalus</i> spp.
<i>Steringophorus furciger</i>	Fellodistomidae	<i>Pleuronectes platessa</i>
<i>Parvatrema affine</i>	Gymnophallidae	<i>Haematopus ostralegus</i>
<i>Derogenes varicus</i>	Derogenidae	<i>Gadus morhua</i>
<i>Cryptocotyle lingua</i>	Heterophyidae	<i>Sterna paradisaea</i>
<i>Bunocotyle progenetica</i>	Hemiuridae	<i>Peringia ulvae</i>
<i>Paramonostomum alveatum</i>	Notocotylidae	<i>Anas platyrhynchos</i>

После вскрытия окончательных хозяев, экстрагированных из их кишечника половозрелых особей дигеней (марит) оставляли в физиологическом растворе Рингера (для холоднокровных) до момента мацерации тканей. Яйца, содержащие личинок, сохранялись после мацерации, и их перемещали в морскую воду (20 ppt). Хранение материала осуществлялось на кафедре зоологии беспозвоночных биологического факультета СПбГУ при температуре 4°C. Методами световой микроскопии проводили анализ общего состояния личинок и степень их зрелости.

Основной метод, использованный в данном исследовании, – трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия (ТЭМ). Пробоподготовку к ТЭМ осуществляли в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий». Яйца, содержащие зрелых мирацидиев, фиксировали на криофиксирующей станции Leica EM HPM100 и оставляли на хранение в жидком азоте. Криозамещение производили на станции Leica EM AFS2. Полученные образцы проводили по возрастающей концентрации смол EPON 812 с увеличенными, относительно используемых при обычной заливке, сроками.

ТЭМ-исследование проводили на базе ЦКП «Таксон» ЗИН РАН. С блоков, в которых были заключены мирацидии, получали прерывистые серии ультратонких срезов личинок в разных проекциях. Серии исследовали на просвечивающем электронном микроскопе FEI Morgagni 268.

Яйца, содержащие мирацидиев *B. progenetica* и *P. alveatum*, использовались для экспериментального заражения моллюска *Peringia ulvae*. Вскрытия моллюсков проводили спустя сутки и две недели после скармливания моллюску яиц. Материнские спороцисты *B. progenetica* были зафиксированы вместе с тканью моллюска 2.5% раствором глутар-альдегида на какодилатном буфере, постфиксированы в 1% растворе OsO₄ и залиты в EPON 812 для ТЭМ-исследования.

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Мирацидии Vucephalata

В данном разделе приводятся ультраструктурные реконструкции мирацидиев *Prosorhynchus squamatus* (Vucephalidae), *Parvatrema affine* (Gymnophallidae) и *Steringophorus furciger* (Fellodistomidae). Схемы-реконструкции и вклейки с электронограммами и оптическими микрофотографиями сопровождаются подробным описанием покровов, мускулатуры, аппарата проникновения, выделительной системы, нервной системы и генеративного материала личинок Vucephalata.

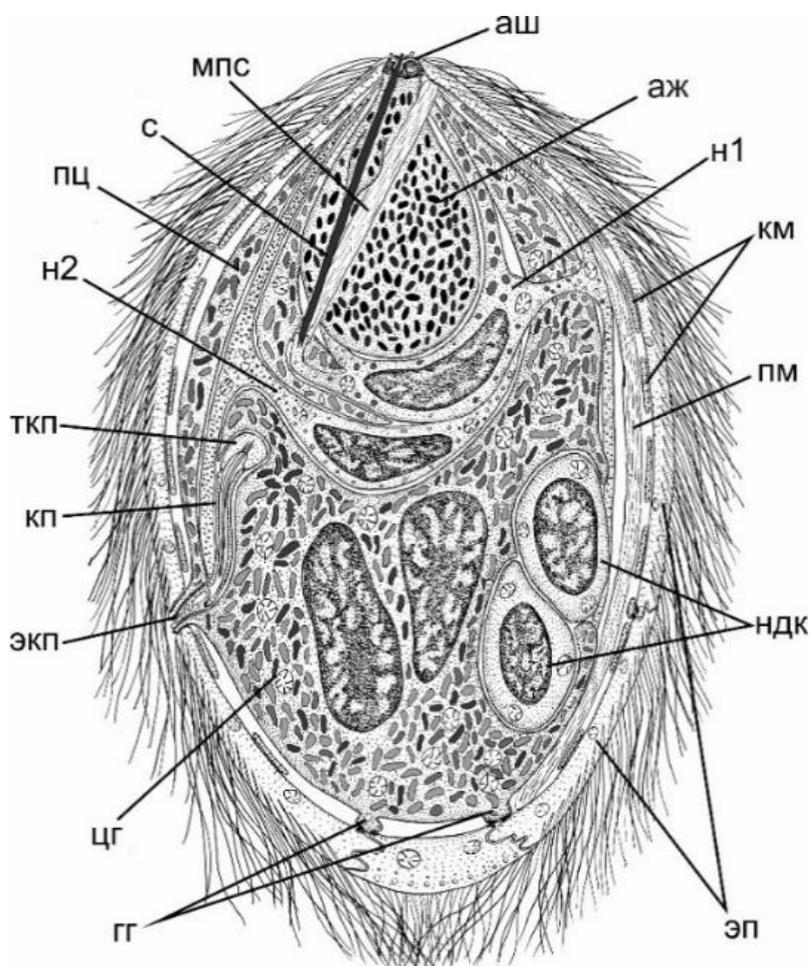


Рисунок 1. Схема-реконструкция мирацидия *Prosorhynchus squamatus*. Сокращения: аж — апикальная железа; аш — шапочка апикальной железы; гг — гиподермальный гребень; км — кольцевая мышечная клетка; кп — канал протофидия; мпс — протрактор стилета; н — нервная клетка; ндк — недифференцированная клетка; пм — продольная мышечная клетка; с — стилет; тkp — терминальная клетка протофидия; цг — гиподермальный цитон; экп — экскреторная пора; эп — эпителиальная пластинка.

тянущимся к переднему концу личинки. Мускулатура стенки тела представлена хорошо развитыми кольцевыми волокнами и единственной клеткой с продольным волокном. Аппарат проникновения включает безъядерную апикальную железу, частью которой является стилет мирацидия (рис. 2с). Передний конец (острие) стилета входит в состав электронно-плотной шапочки апикальной железы, задний конец связан с мышечной клеткой-протрактором стилета. Два мультиполярных нейрона составляют нервную систему личинки (рис. 2b). Один из них связан отростком с протрактором стилета, сенсорное окончание цилиарного типа расположено на шапочке апикальной железы. Выделительная система представлена единственным протонефридием (рис. 2d), состоящим из безъядерного олигоцилиарного циртоцита, клетки-канала и экскреторной поры, открывающейся на поверхности гиподермального гребня. Две недифференцированные клетки, залегающие в задней половине мирацидия, составляют генеративный материал (рис. 2d).

3.1.2 Мирацидий *Parvatrema affine* (рис. 3, 4)

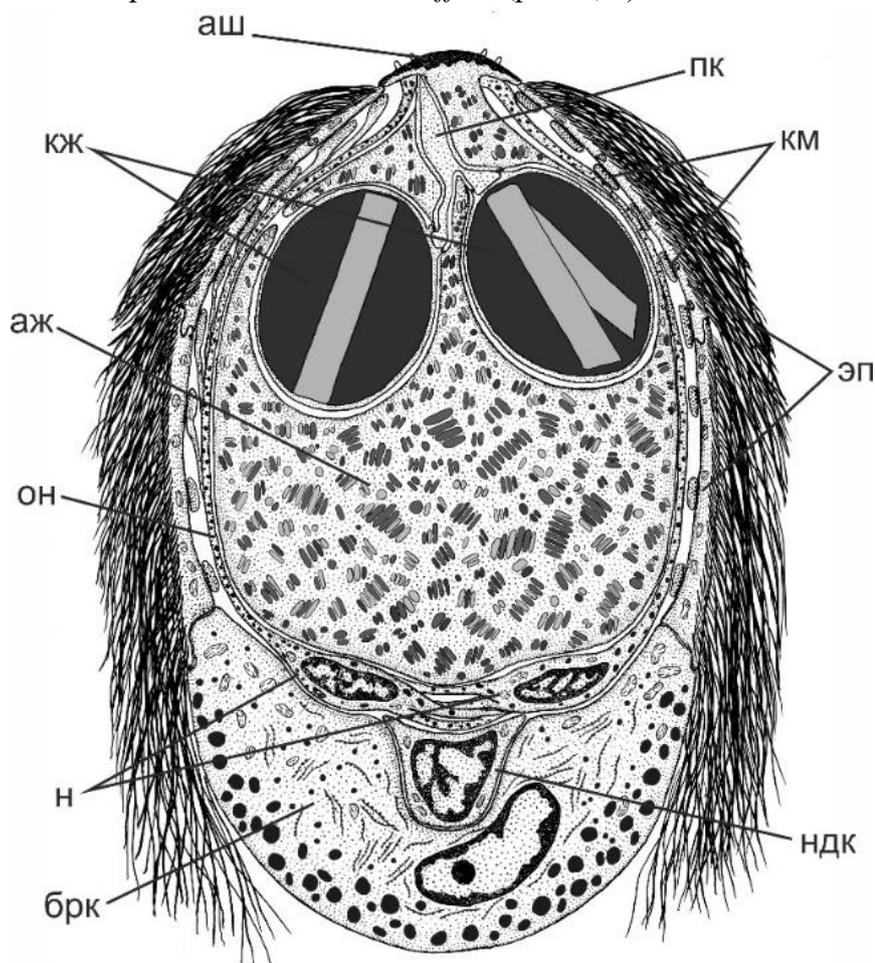


Рисунок 3. Схема-реконструкция мирацидия *Parvatrema affine*. Сокращения: аж – апикальная железа; аш – апикальная шапочка; брк – безресничная клетка (протегумент); кж – кристаллические железы; км – кольцевые мышечные клетки; н – нейрон; ндк – недифференцированные клетки; он – отросток нейрона; ПК – проток кристаллических желез; эп – эпителиальные пластинки.

Приблизительные размеры мирацидия *P. affine*: 10x20 мкм. Покровы представлены двумя поперечными рядами ресничных эпителиальных пластинок и одной одноядерной безресничной клеткой (протегумент), формирующей покровы задней трети тела мирацидия (рис. 4а). Покровные клетки связаны друг с другом специализированными клеточными контактами двух типов (изолирующий контакт и контакт, напоминающий десмосому) (рис. 4b). Не менее девяти клеток составляют кольцевую мускулатуру мирацидия, продольная мускулатура полностью редуцирована. Аппарат проникновения представлен крупной безъядерной апикальной железой, занимающей большую часть внутреннего объема личинки и двумя кристаллическими железами, связанными с единым протоком (рис. 4а). Нервная система состоит из двух мультиполярных нейронов, залегающих в задней трети мирацидия (рис. 4а). На переднем конце личинки в шапочку апикальной железы «встроены» две сенсиллы цилиарного типа (рис. 4с). Выделительная система мирацидия

полностью редуцирована. Генеративный материал представлен единственной недифференцированной клеткой, «вдавленной» в безресничную покровную клетку (рис. 4d).

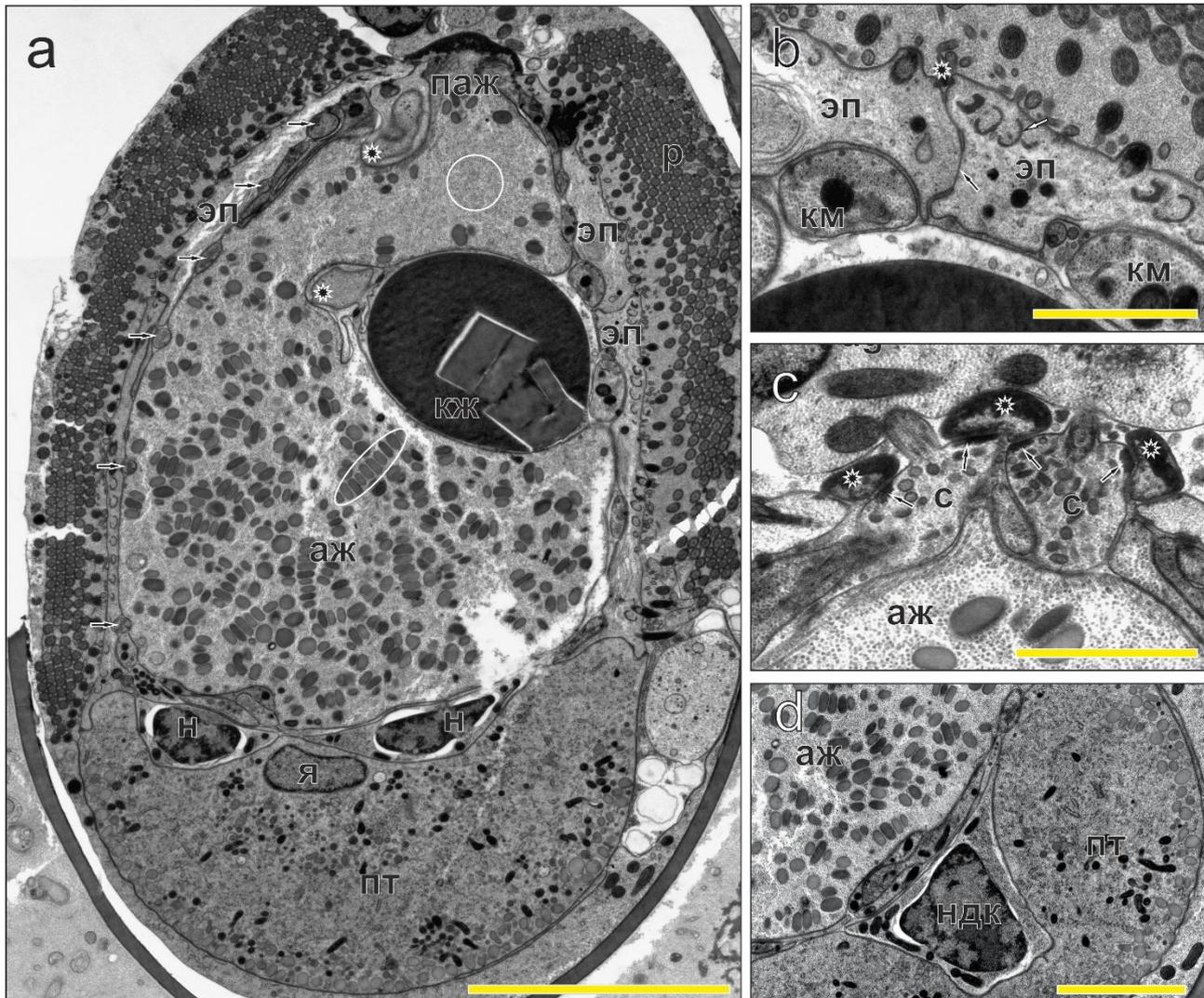


Рисунок 4. Электронограммы срезов через мирацидия *P. affinis*. а – сагиттальный срез через мирацидия, стрелки указывают на кольцевые мышечные клетки, звездочкой отмечен проток кристаллических желез, гликоген-подобные гранулы обведены в кружок, стопки гранул секрета – в овал, масштаб: 5 мкм; б – связь между эпителиальными пластинками, черная стрелка указывает на “gap junction”, звездочкой отмечена десмосома, белая стрелка указывает на исчерченные корешки; масштаб: 1 мкм; в – сенсорные окончания, стрелки указывают на кольцевые десмосомы, звездочками отмечена шапочка апикальной железы, масштаб: 1 мкм; д – недифференцированная клетка, звездочкой отмечена ее цитоплазма, масштаб: 1 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; кж – кристаллическая железа; км – кольцевые мышечные клетки; н – нейрон; ндк – недифференцированная клетка; п – проток кристаллической железы; паж – проток апикальной железы; пт – клетка протегумента; р – реснички; с – сенсорные окончания; эп – эпителиальная пластинка; я – ядро протегумента.

3.1.3 Мирацидий *Steringophorus furciger* (рис. 5, 6)

Приблизительные размеры мирацидия *S. furciger*: 30x15 мкм. Покровы представлены пятью эпителиальными пластинками, из которых четыре – ресничные – покрывают переднюю половину тела, одна, по большей части лишённая ресничек, – формирует заднюю половину (рис. 6а). Эпителиальные пластинки связаны друг с другом контактами типа «tight junctions», также пластинки формируют десмосомы с гиподермальными гребнями (рис. 6б). Гиподерма представлена гиподермальным телом, залегающим в задней трети личинки (под задней эпителиальной пластинкой), отходящими от него спиральными гребнями (под передними эпителиальными пластинками) и двуядерным цитомом (рис. 6а). Мускулатуру составляют 22 клетки с кольцевым волокном и шесть клеток с продольным. Аппарат проникновения представлен безъядерной апикальной железой, занимающей переднюю половину личинки. Между апикальной железой и цитомом гиподермы залегают два мультиполярных нейрона (рис. 6а). Выделительная система

полностью редуцирована. Генеративный материал представлен двумя недифференцированными клетками, «сжатыми» между гиподермальным телом и цитон гиподермы (рис. 6d).

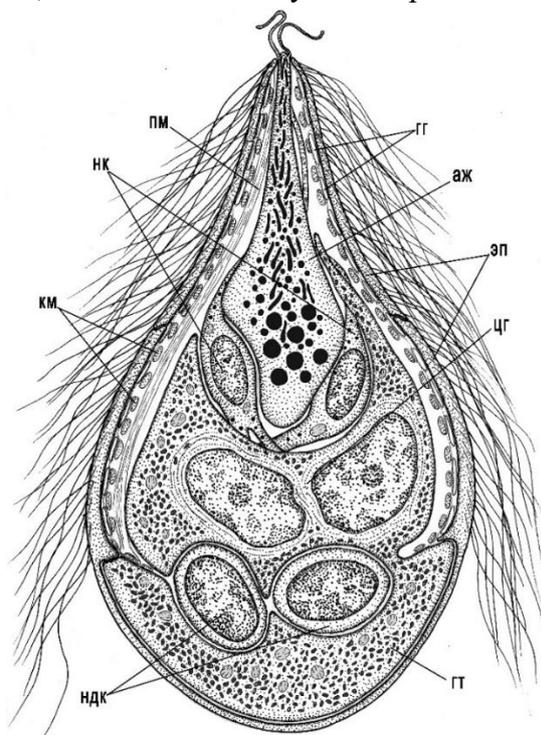


Рисунок 5. Схема-реконструкция мирацидия *Steringophorus furciger*. Сокращения: аж – апикальная железа, гг – гиподермальные гребни, гт – тело гиподермы, км – кольцевые мышечные клетки, нк – нервные клетки, ндк – недифференцированные клетки, пм – продольные мышечные клетки, цг – цитон гиподермы, эп – эпителиальные пластинки.

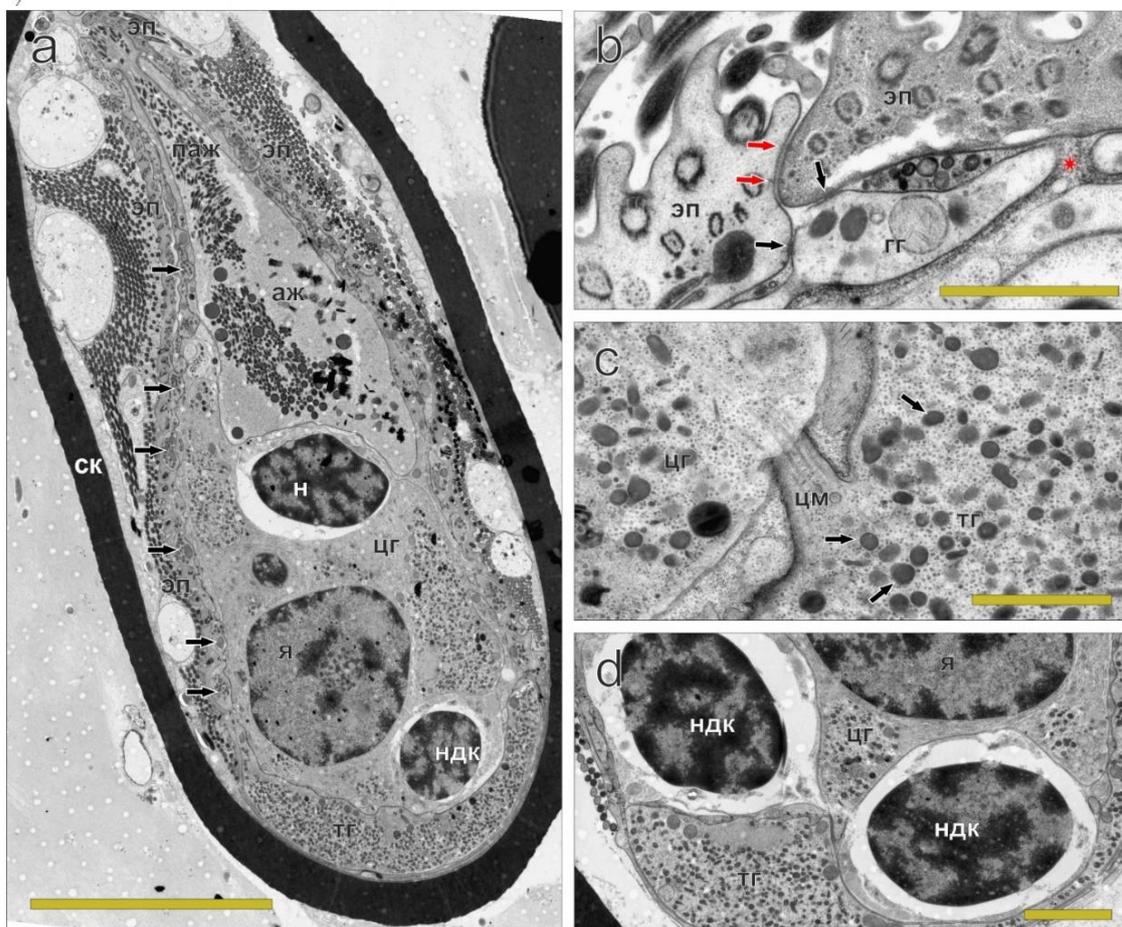


Рисунок 6. Электронограммы срезов через мирацидия *S. furciger*. а – продольный срез через всего мирацидия, черными стрелками отмечены гиподермальные гребни, масштаб: 10 мкм; б – срез через место соприкосновения эпителиальных пластинок, черные стрелки указывают на десмосомы, связывающие пластинки с гиподермальным гребнем, красные стрелки указывают на контакты между пластинками, красной звездочкой отмечена базальная пластинка, черными – корешки ресничек, масштаб: 1 мкм; в – срез через цитоплазматический мостик, соединяющий цитон гиподермы с телом гиподермы, стрелки указывают на секреторные гранулы. Масштаб: 2 мкм; г – срез через недифференцированные клетки, масштаб: 2 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; гт – гиподермальное тело; н – нейрон; ндк – недифференцированные клетки; паж – проток апикальной железы; ск – скорлупка яйца; тг – тело гиподермы; цг – цитон гиподермы; цм – цитоплазматический мостик; эп – эпителиальная пластинка.

3.2 Мирациии Hemiurata

Данный раздел содержит детальные реконструкции мирацидиев *Derogenes varicus* (Derogenidae) и *Bunocotyle progenetica* (Hemiuridae), а также ультраструктурные данные по материнской спороцисте *B. progenetica* спустя сутки и 14 суток после заражения моллюсков *Peringia ulvae*.

3.2.1 Мирацидий *Derogenes varicus* (рис. 7, 8)

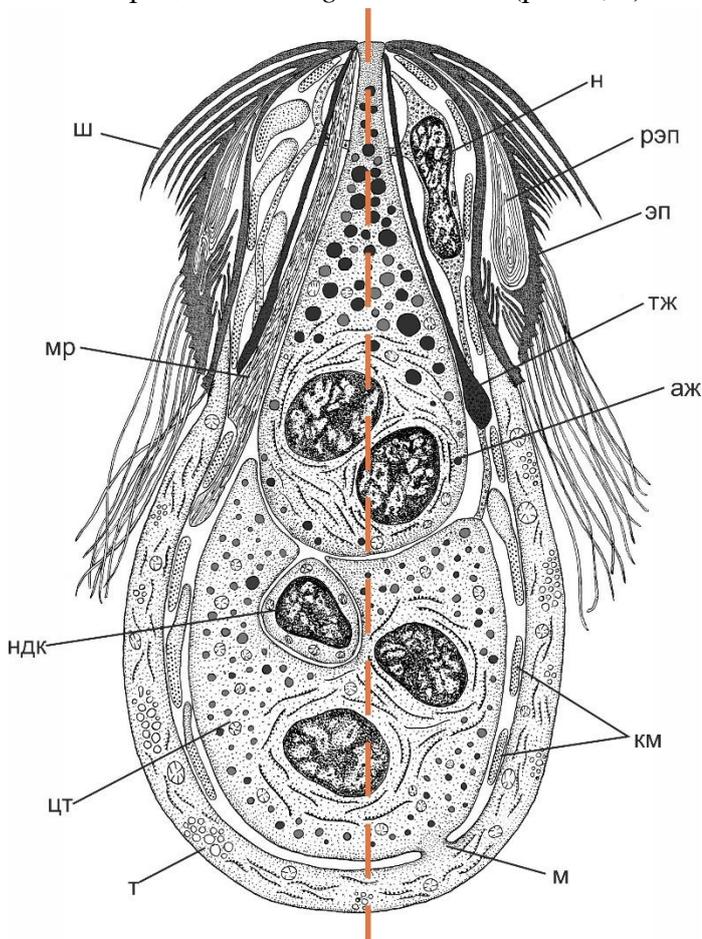


Рисунок 7. Схема-реконструкция мирацидия *Derogenes varicus*. Сокращения: аж – апикальная железа; км – кольцевые мышечные клетки; м – цитоплазматический мостик (связывающий цт и т); мр – мышечная клетка-ретрактор; н – нейрон; ндк – недифференцированная клетка; рэп – ребро эпителиальной пластинки; т – пластинка тегумента; тж – «темная» железа; цт – цитон тегумента; ш – шипы; эп – эпителиальная пластинка. *Схема выполнена таким образом, что ее левая и правая части являются продольными срезами через радиусы, обусловленные расположением эпителиальных пластинок. (совмещение продольных латеральных проекций).

Приблизительные размеры мирацидия *D. varicus*: 15x10 мкм. Личинка гантелевидной формы, ее передний конец способен вворачиваться. Большая часть покровов представлена тегументом, на передней трети тела личинки радиально-симметрично расположены три эпителиальные пластинки (рис. 8а). Поверхность передней части каждой эпителиальной пластинки несет шипы, задней части – реснички. Тегумент связан цитоплазматическим мостиком с двудерным цитоном, залегающим в задней половине тела мирацидия (рис. 8б). Мускулатура представлена девятью кольцевыми элементами и двумя клетками-ретракторами переднего конца. Аппарат проникновения составляют крупная двудерная апикальная железа и пара «темных» желез (цитоплазма этих желез характеризуется высокой электронной плотностью) (рис. 8а). Обнаружен единственный нейрон, тело которого лежит в передней половине мирацидия (рис. 8а). Выделительная система полностью редуцирована. Генеративный материал представлен одной недифференцированной клеткой, расположенной между апикальной железой и цитоном тегумента (рис. 8б).

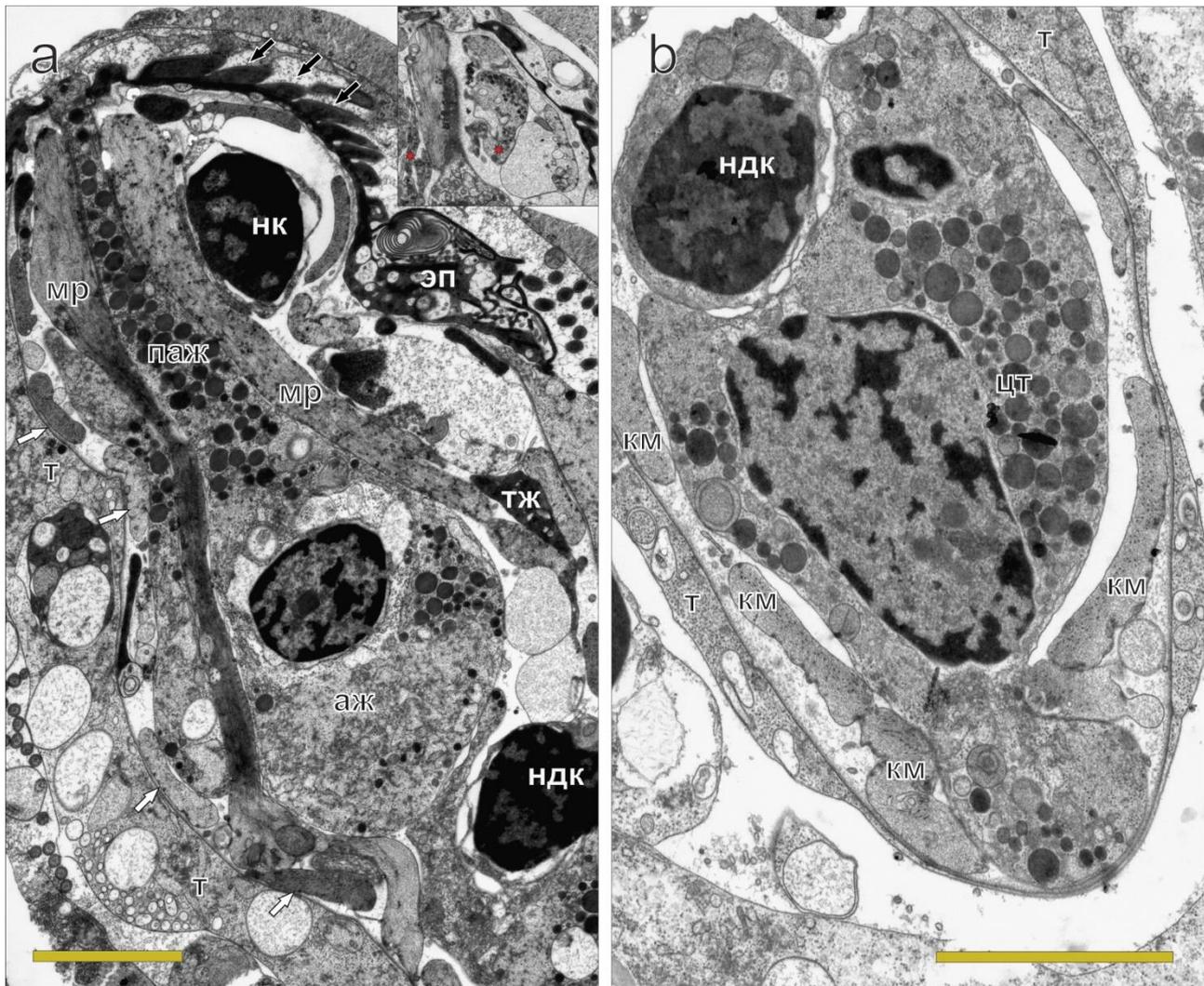


Рисунок 8. Электронограммы срезов через мирацидия *D. varicus*. а – срез через переднюю половину мирацидия (черные стрелки указывают на шипы, белые – на кольцевые мышечные клетки, в бок вынесен участок другого среза из этой же серии, показывающий нервный отросток), масштаб: 2 мкм; б – срез через задний конец, масштаб: 2 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; км – кольцевые мышечные клетки; мр – мышечная клетка-ретрактор хоботка; н – нервная клетка; ндк – недифференцированная клетка; паж – проток апикальной железы; т – пластинка тегумента; тж – «темная» железа; ш – шипы; эп – эпителиальная пластинка.

3.2.2. Мирацидий *Bunocotyle progeneretica* (рис. 9, 10)

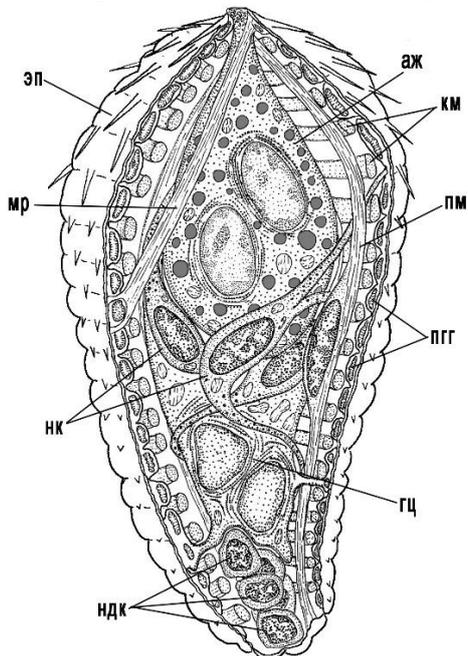


Рисунок 9. Мирацидий *Bunocotyle progeneretica* – оригинальная схема-реконструкция, сделанная на основе опубликованной ранее схемы поверхности мирацидия (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). Сокращения: аж – апикальная железа; гц – гиподермальный цитон; км – кольцевые мышечные клетки; мр – мышца-ретрактор; нк – нервные клетки; ндк – недифференцированные клетки; пгг – поперечные гиподермальные гребни; эп – эпителиальные пластинки.

Приблизительные размеры мирацидия: 25x10 мкм. Покровы личинки представлены тремя продольно вытянутыми эпителиальными пластинками. Пластинки несут шипы, расположенные рядами по размерному градиенту: самые длинные на переднем конце, самые короткие – на заднем (рис. 10а, б). Пластинки связаны с продольными гиподермальными гребнями септированными контактами. Помимо продольных гребней, гиподерма формирует кольцевые гребни, расположенные под поперечными рядами шипов эпителиальных пластинок (рис. 10с). Все гиподермальные гребни связаны между собой. Посредством цитоплазматических мостиков гребни связываются с двуядерным цитоном, который занимает большую часть объема задней половины мирацидия. Кольцевая и продольная мускулатура хорошо развита, имеются мышцы-ретракторы переднего конца тела. Большую часть объема передней половины тела мирацидия занимает двуядерная апикальная железа (рис. 10а). Нервная система представлена скоплением из трех-четырех нейронов, лежащих между апикальной железой и цитоном гиподермы. Специализированная выделительная система отсутствует. Генеративный материал представлен группой из четырех-пяти недифференцированных клеток, лежащих в задней четверти тела мирацидия (рис. 10d).

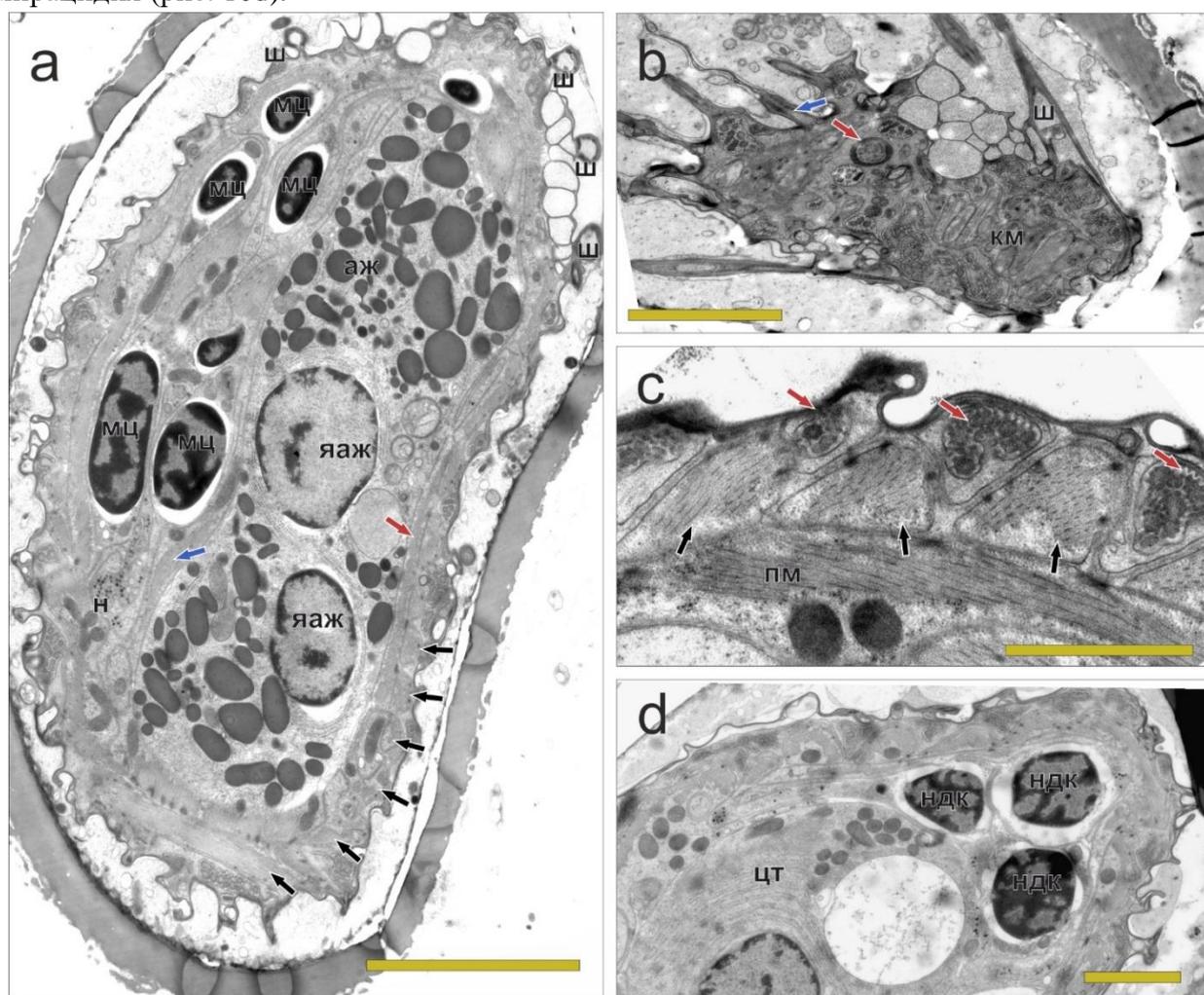


Рисунок 10. Электронограммы срезов через мирацидия *B. progenetica*. а – продольный срез через переднюю половину тела мирацидия. Синяя стрелка указывает на продольную мышечную клетку, красная – на мышцу-ретрактор, черные – на кольцевые мышечные клетки, масштаб: 5 мкм; б – срез через поверхность мирацидия, синяя стрелка указывает на продольный гиподермальный гребень, красная стрелка указывает на сенсорное окончание, масштаб: 2 мкм. Сокращения: кгг – кольцевой гиподермальный гребень, км – кольцевые мышечные клетки, н – нервные отростки, ндк – недифференцированная клетка, пм – продольные мышечные клетки, цт – цитон гиподермы, ш – шипы, яаж – ядра апикальной железы.

3.2.3 Материнская спороциста *Bunocotyle progenetica* (рис. 11)

Спустя сутки после заражения моллюска *Peringia ulvae* яйцами с мирацидиями *B. progenetica* материнские спороцисты были обнаружены в полости его предсердия. Размер однодневных спороцист лишь немногим превышает размер мирацидиев. Обнаруженные спороцисты активно двигались. Покровы материнских спороцист представлены тонким слоем тегумента, поверхность которого несет множество хаотично расположенных микровилл (рис. 11b). Тегумент на этом этапе развития материнской спороцисты связан с единственным двуядерным цитонем, «унаследованным» от мирацидия (рис. 11a). Диспергированное состояние хроматина в ядрах цитона, наличие обширного шероховатого ЭПР указывает на существенную секреторную активность цитона. По сравнению с мирацидием, у однодневной спороцисты увеличено число мышечных клеток, формирующих два слоя волокон (кольцевых и продольных). После метаморфоза у спороцисты сохраняется апикальная железа, секрет-продуцирующий аппарат которой столь же развит, как и у цитона (рис. 11a). В задней половине спороцисты имеется скопление клеток, часть из которых, судя по наличию гранул нейромедиатора, являются нервными, а другая часть – недифференцированными.

Спустя две недели после заражения моллюска материнская спороциста существенно увеличивается в размерах, по-прежнему оставаясь в полости предсердия. К сожалению, задняя половина тела двухнедельной спороцисты была утрачена при изготовлении срезов, данные о ее строении фрагментарны. Тегумент двухнедельной спороцисты фактически не отличается по структуре от тегумента однодневной особи (рис. 11c). По-прежнему сохраняется крупный активный двуядерный цитон, к этому моменту появляются и новые маленькие цитоны (рис. 11c). Развивается межклеточное вещество (клетки лежат более рыхло по сравнению с однодневной спороцистой). Передний конец все еще несет двуядерную апикальную железу (рис. 11c). Также в передней половине тела двухнедельной спороцисты было обнаружено несколько неактивных, ни с чем не связанных клеток, которые мы расцениваем как недифференцированные (рис. 11d).

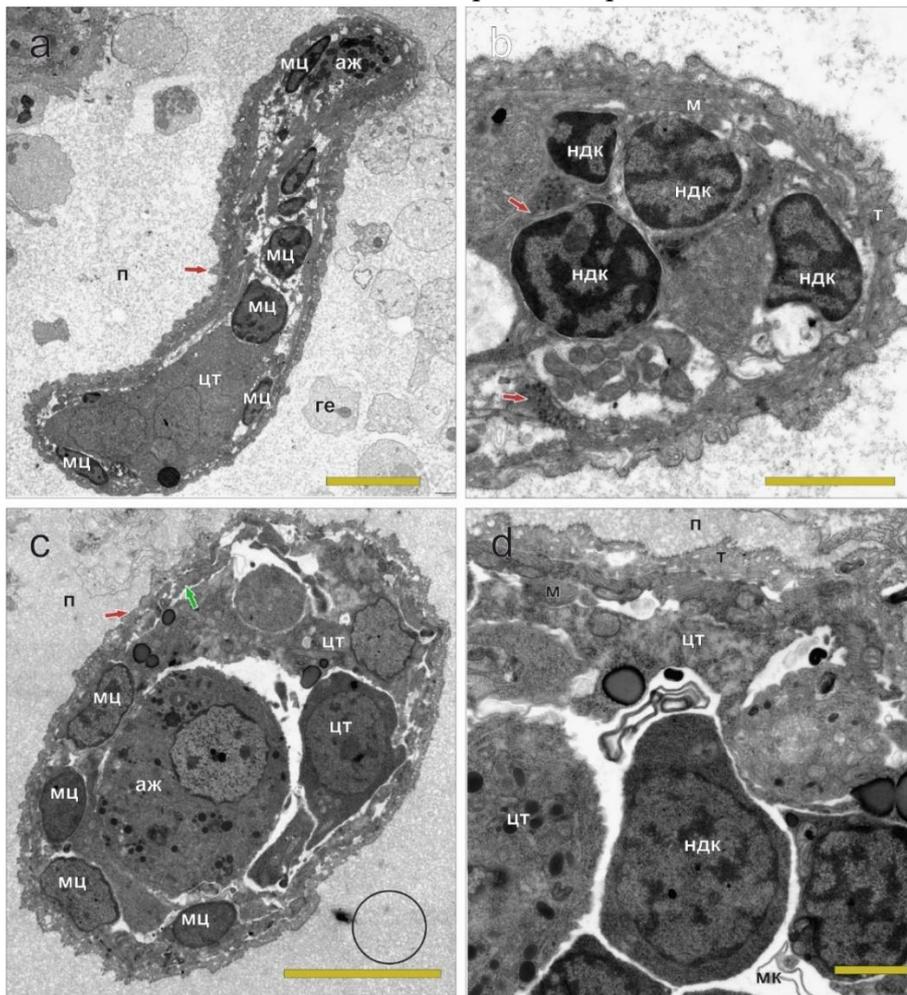


Рисунок 11. Электронограммы срезов через материнскую спороцисту *B. progenetica*. а – косой срез через среднюю часть однодневной спороцисты; красная стрелка указывает на тегумент, масштаб: 5 мкм; б – срез через задний конец однодневной спороцисты; красные стрелки указывают на нервные отростки, масштаб: 2 мкм; с – косой срез через переднюю половину двухнедельной спороцисты; красная стрелка указывает на тегумент, зеленая – на мышечные клетки; в кружок обведено гранулярное содержимое гемолимфы, масштаб: 5 мкм; д – срез через покровы двухнедельной спороцисты, масштаб: 1 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; ге – гемоцит моллюска; м – мышечная клетка; мк – межклеточное пространство; мц – миоцитон; ндк – недифференцированная клетка; п – полость предсердия; т – тегумент; цт – цитон тегумента.

3.3 Мирацидий *Opisthorchiata*

В данном разделе приводится реконструкция мирацидия *Cryptocotyle lingua* (Heterophyidae), основанная на комбинации светооптических наблюдений и ультраструктурных данных.

Мирацидий *Cryptocotyle lingua* (рис. 12, 13)

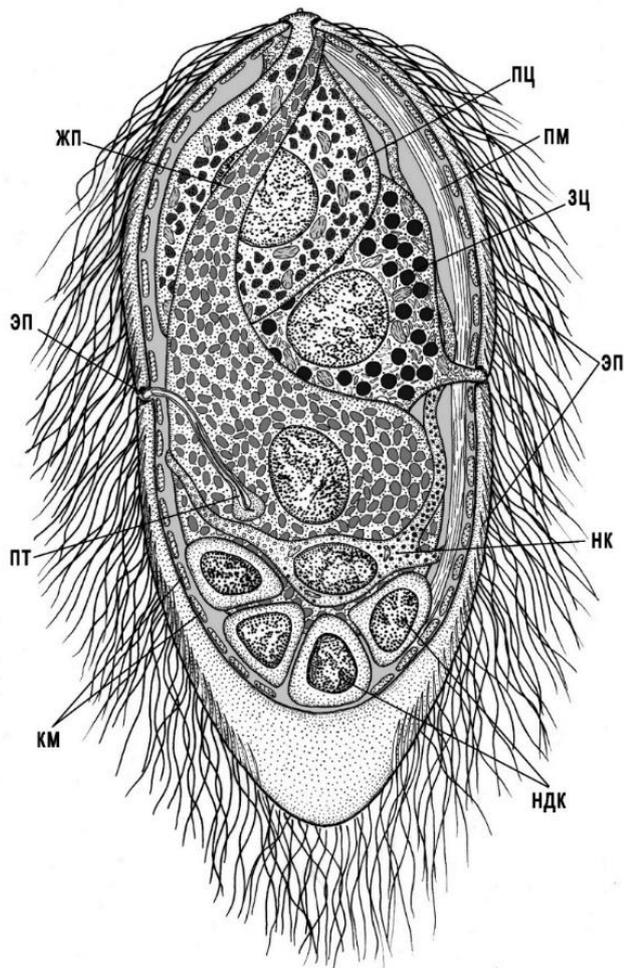


Рисунок 12. Мирацидий *Cryptocotyle lingua* – схема-реконструкция. Сокращения: жп – железа проникновения; зц – задний цитон; км – кольцевые мышечные клетки; нк – нейрон; ндк – недифференцированные клетки; пц – передний цитон; пм – продольная мышечная клетка; пт – протонефридий; экп – экскреторная пора; эп – эпителиальная пластинка.

Приблизительные размеры яйца 50x20 мкм. Мирацидий занимает большую часть объема яйца, оставляя около 1/5 части пространства свободной. Покровы личинки представлены четырьмя эпителиальными пластинками, три из которых формируют поверхность передней половины тела, одна конусовидная пластинка – поверхность задней половины (рис. 13а, б). Эпителиальные пластинки связаны десмосомами с узкими гиподермальными гребнями. Гребни связаны с двумя одноядерными гиподермальными цитонами, которые расположены один за другим в передней четверти мирацидия (рис. 13а). Передний цитон формирует проток, открывающийся на апексе личинки. Задний цитон связан цитоплазматическим мостиком с поперечным гиподермальным гребнем, расположенным между тремя передними и одной задней эпителиальными пластинками. Мускулатура представлена примерно 20 кольцевыми волокнами и одним продольным. Основной компонент аппарата проникновения – крупная железистая клетка, занимающая большую часть внутреннего объема личинки (рис. 13б). Проток этой железы дугообразно изогнут в передней половине личинки, открывается на переднем ее конце, встраиваясь в проток переднего цитона гиподермы (рис. 13а). Из элементов нервной системы удалось достоверно идентифицировать один нейрон, залегающий в задней половине тела (рис. 13б). Выделительная система представлена одним протонефридием с олигоцилиарным циртоцитом, экскреторная пора связана с поперечным гиподермальным гребнем. В задней части мирацидия располагается группа из четырех недифференцированных клеток, формирующих генеративный материал личинки (рис. 13б).

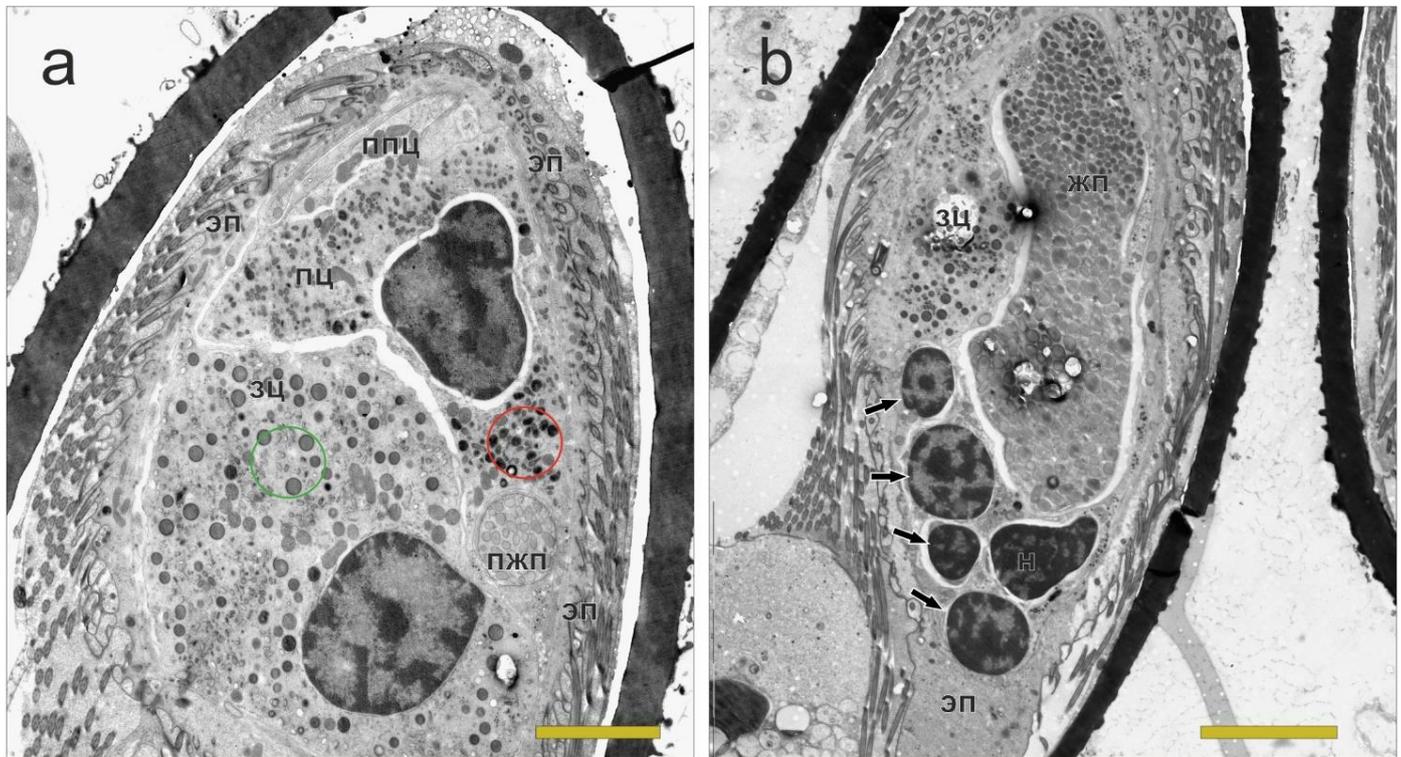


Рисунок 13. Электронограммы срезов через мирацидия *C. lingua*. а – косой срез через переднюю половину мирацидия; в красный кружок обведены секреторные гранулы переднего цитона гиподермы, в зеленый – заднего, масштаб: 3 мкм; б – косой срез через заднюю половину тела мирацидия; черными стрелками отмечены недифференцированные клетки, масштаб: 5 мкм. Сокращения: жп – железа проникновения; зц – задний цитон; н – нейрон; пц – передний цитон; ппц – проток переднего цитона; пжп – проток железы проникновения; эп – эпителиальная пластинка.

3.4 «Мирацидий»¹ *Notocotylidae* (рис. 14)

В данном разделе приводятся светооптические и ультраструктурные данные по строению содержимого яйца *Paramonostomum alveatum*, а также светооптические данные, полученные в ходе заражения моллюска *Peringia ulvae*.

Яйцо *P. alveatum* содержит пару желточных клеток, желточную мембрану и «мирацидия» (рис. 14а, б, с). Желточная мембрана, подстилая скорлупку яйца, несет в своей цитоплазме полярный U-образный оперкулярный тяж (рис. 14б, с). В состав тела исследованных нами «мирацидиев» входят две-три генеративные клетки, в цитоплазме которых имеется множество структур типа «нуаж» (nuage/герминальные гранулы – органеллы, присутствующие в цитоплазме клетки герминальной линии), и пластинка тегумента, окружающая генеративные клетки (рис. 14а). Последняя несет два ядра и сферические секреторные гранулы. Спустя две недели после скармливания моллюскам *P. ulvae* яиц *P. alveatum* в гемолимфе моллюска при вскрытии была обнаружена материнская спороциста, имевшая вид полого тонкостенного мешка. При светооптическом наблюдении за спороцистой, целостность ее стенки почти сразу была нарушена, и наружу высвободились три небольшие редии (рис. 14д). Приблизительная длина редий: 50-70 мкм. Редии малоподвижны, но уже способны изменять форму своего тела, слегка сокращаясь и вытягиваясь. В передней части редии сформирована (или находится в процессе формирования) глотка. Тело редии плотно забито клетками, никаких следов развития зародышевой полости и кишки на этом этапе онтогенеза редии не обнаружено.

¹ Здесь и далее термин взят в кавычки, так как данная личинка полностью утратила признаки мирацидия, фактически став материнской спороцистой (Murrils et al., 1985)

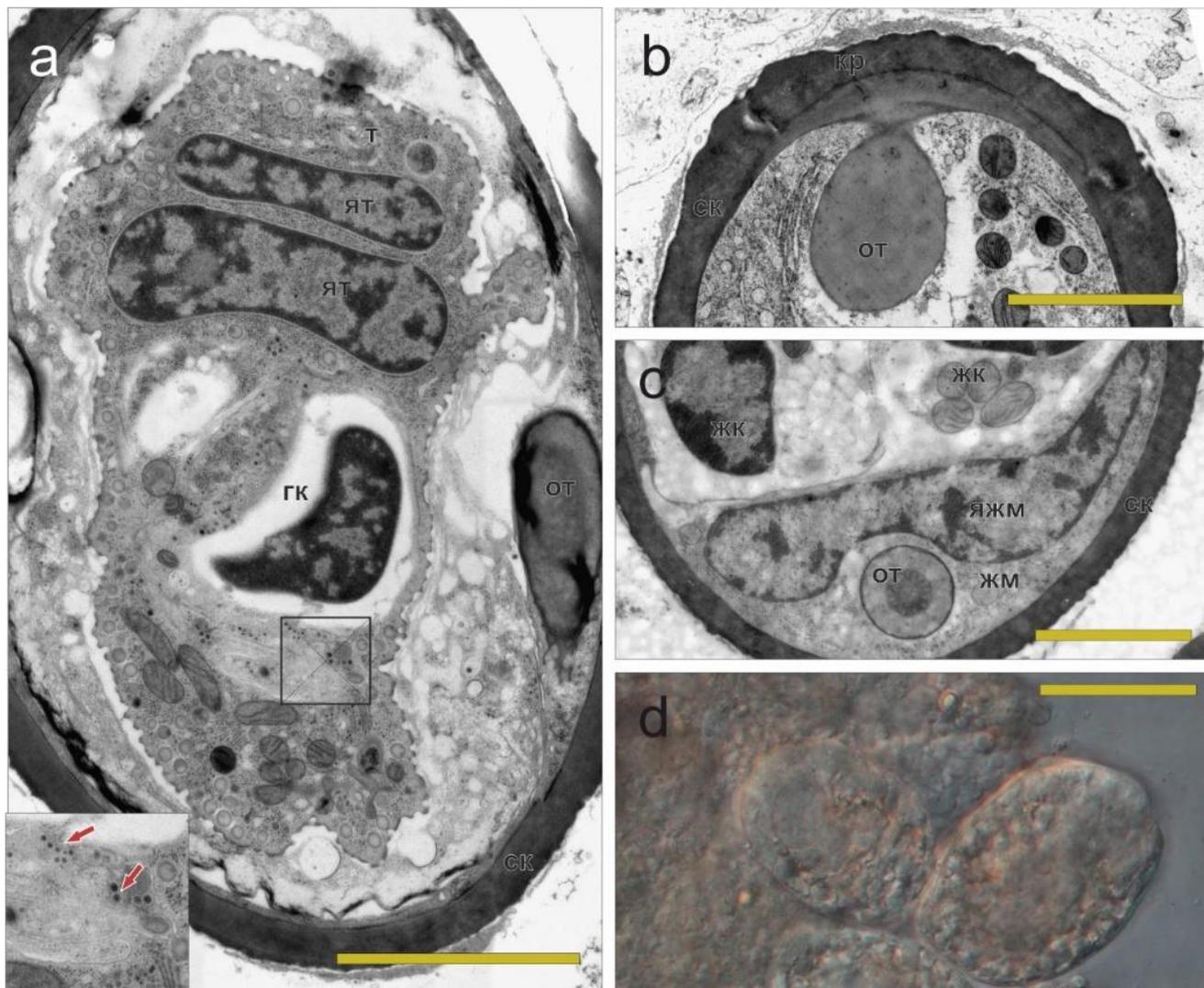


Рисунок 14. «Мирацидий» *P. alveatum* и дочерние спорозоиты в гемолимфе моллюска. а – продольный срез через яйцо; красные стрелки указывают на тельца «нуаж», масштаб: 3 мкм; б – срез через крышечку яйца, масштаб: 2 мкм; в – срез через место изгиба оперкулярного тяжа, масштаб: 2 мкм, д – молодые материнские редии, развившиеся за 14 дней заражения, масштаб: 50 мкм. Сокращения: гк – генеративная клетка; жм – желточная мембрана; жк – желточная клетка; кр – крышечка; от – оперкулярный тяж; ск – скорлупка яйца; т – тегумент; ят – ядро тегумента.

3.5 Обсуждение

Переход мирацидиев к пассивной стратегии заражения моллюсков – значимое событие в эволюции Digenea. Фактически, это одна из тенденций, которой независимо последовали представители разных ветвей эволюции дигенетических сосальщиков (Cribb et al., 2003). Каждый случай перехода наложил глубокий отпечаток на морфофункциональную организацию мирацидиев. Выражен этот отпечаток очень по-разному: некоторые «пассивные» личинки, хоть и крайне модифицированы по сравнению с «активными», все же сохранили их основные признаки, другие же изменились «до неузнаваемости». Сравнение «пассивных» мирацидиев филогенетически далеких друг от друга дигеней позволяет утверждать, что процесс перехода к пассивной стратегии заражения ассоциирован с тремя тенденциями. Первая и, возможно, главная – миниатюризация. Вторая, во многом связанная с первой, – редукция клеточных систем, потерявших функциональную нагрузку при «пассивном» заражении. Третья – специализация систем, которые по-прежнему необходимы в новых условиях, но неэффективны в своем первоначальном виде. Очевидно, что проявляются эти тенденции весьма различно, и в строении каждого «пассивного» мирацидия отражается влияние комбинации этих тенденций.

3.5.1 Мирацидии *Vucephalata*

Судя по полученным в ходе нашего исследования данным и опубликованным ранее сведениям, все мирацидии *Vucephalata* используют пассивную стратегию заражения первого промежуточного хозяина. Переход к пассивной стратегии повлек за собой существенные морфофункциональные преобразования, выраженные по-разному у личинок *Pr. squamatus* (*Vucephalidae*), *S. furciger* (*Fellodistomidae*) и *P. affine* (*Gymnophallidae*). Различия позволяют строить морфологические ряды, которые, как мы считаем, могут отражать этапы эволюции мирацидиев данной группы (Smirnov, Dobrovolskij, 2019; Smirnov, Dobrovolskij, 2021; Smirnov, Gonchar, 2022).

Организация исследованных нами мирацидиев *Vucephalata* демонстрирует этапы смены типа покровов и редукции ресничного аппарата. Для личинки *Pr. squamatus* характерно наличие эпителиальных пластинок, связанных с гиподермальными гребнями, залегающими под местом соприкосновения соседних пластинок – схема, идентичная тому, что описано для «активных» мирацидиев (Smirnov, Dobrovolskij, 2019). Личинка *S. furciger* отклонилась от этой схемы: ее гиподермальные гребни спирально закручены под эпителиальными пластинками (Smirnov, Gonchar, 2022). В этом случае пластинки и гребни по-прежнему связаны, но и сами пластинки оказываются соединены друг с другом специализированными контактами. Задняя поверхность мирацидия при этом утратила реснички. Наконец, мирацидий *P. affine* полностью сменил тип покрова: гиподермальные гребни редуцировались, а эпителиальные пластинки вторично организовались в настоящий эпителий. При этом заднюю поверхность личинки *P. affine* формирует бесресничная клетка (протегумент) гиподермального происхождения (Smirnov, Dobrovolskij, 2021). Описанную тенденцию мы связываем с несоответствием ресничного способа локомоции условиям слизистого содержимого кишки моллюска. По нашему мнению, исследованные нами мирацидии *Vucephalata* демонстрируют этапы «тегументизации» покровов – редукцию эпителиальных пластинок и их замещение синцитиальным неодермисом (Smirnov, Gonchar, 2022).

Сравнение исследованных мирацидиев *Vucephalata* выявляет тенденцию редукции продольной мускулатуры. Полноценно продольные мышцы развиты лишь у личинки *S. furciger*. Мирацидий *Pr. squamatus* несет только одну клетку с продольным волокном, мирацидий *P. affine* вовсе лишен продольной мускулатуры. Мы предполагаем, что слизистое содержимое кишки моллюска-хозяина может затруднять не только ресничную, но и мышечную локомоцию. Отсутствие продольной мускулатуры, как антагониста кольцевой, делает локомоцию невозможной, из чего мы делаем вывод о том, что, вероятно, «пассивные» мирацидии *Vucephalata* в большей степени полагаются на случайное попадание к месту внедрения в кишечный эпителий (Smirnov, Gonchar, 2022).

Нервная система мирацидиев *Vucephalata* редуцирована в равной степени у исследованных нами личинок – до двухклеточного состояния (Smirnov, Dobrovolskij, 2019; Smirnov, Dobrovolskij, 2021; Smirnov, Gonchar, 2022). Очевидно, что отсутствие необходимости в поиске первого промежуточного хозяина сделало возможным столь глубокую редукцию. Мы полагаем, что функции нервной системы у мирацидиев *Vucephalata* свелись к детекции некоторого сигнала (химической или механической природы), исходящего от кишки моллюска и активации программы проникновения в кишечный эпителий. Несмотря на одинаковый уровень редукции, в деталях исследованные нами нервные системы различаются, что подробно обсуждается в тексте диссертации.

Отчетливо выражена тенденция редукции выделительной системы у мирацидиев *Vucephalata* (Smirnov, Dobrovolskij, 2019; Smirnov, Dobrovolskij, 2021; Smirnov, Gonchar, 2022). Только для личинки *Pr. squamatus* характерно наличие одного протонефридия, у мирацидиев *S. furciger* и *P. affine* выделительная система отсутствует вовсе. Неизвестно, нуждаются ли мирацидии, проводящие большую часть своей жизни в изоляции от внешней среды, в регуляции осмотического давления, должны ли они избавляться от некоторых отходов жизнедеятельности и могут ли они

удалять их альтернативно. Ясно, что после заражения и метаморфоза, спороцисты *Vucephalata* должны строить свои выделительные системы *de novo*.

Аппарат проникновения личинок *Vucephalata*, в отличие от других систем, существенно развит. Проникновение в ткани моллюска – главная цель мирацидия, которая остается актуальной и после перехода к пассивной стратегии заражения. Апикальная железа занимает большой объем у каждой из трех исследованных личинок. Нельзя не отметить наличие связанных с аппаратом проникновения морфологических новшеств, таких как стилет у *Vucephalidae* и кристаллические железы у *Gymnophallidae*. Эти особенности можно рассматривать как результат специализации личиночных структур для проникновения в эпителий кишечника – процесс, который, вероятно, сильно отличается от проникновения через наружные покровы.

Генеративный материал исследованных нами личинок *Vucephalata* устроен в общих чертах единообразно. Его составляют недифференцированные клетки. Очевидно, что пассивные мирацидии *Vucephalata* подвержены влиянию тенденции сдерживания развития зародышевого материала (Smirnov, Dobrovolskij, 2019; Smirnov, Dobrovolskij, 2021; Smirnov, Gonchar, 2022).

3.5.2 Мирацидии *Hemiurata*

Переход к пассивной стратегии заражения сильно повлиял на строение мирацидиев *Hemiurata* и привел к значительной редукции большинства систем. В то же время освоение новой среды обитания – кишки моллюска – повлекло за собой ряд существенных модификаций покровов у этих личинок. Полученные данные подтверждают наше предположение о неэффективности ресничной локомоции пассивных личинок (Смирнов, Крупенко, 2023). Судя по имеющимся в литературе описаниям мирацидиев *Hemiurata*, в рамках этого таксона можно наблюдать все этапы редукции ресничного покрова от полностью покрытых ресничками форм до полностью их лишенных. Важнейшей частной тенденцией эволюции мирацидиев *Hemiurata* является «освоение» шипов на поверхности эпителиальных пластинок. Покровные клетки, лишенные «привычной» функциональной нагрузки, приобретают новую функцию, фактически становясь частью аппарата проникновения (Смирнов, Крупенко, 2023).

Сравнивая внутреннее строение исследованных нами гемиуридных личинок, можно сказать, что они устроены весьма схожим образом. И у мирацидия *B. progenetica*, и у *D. varicus* большую часть внутреннего объема занимает крупная апикальная двуядерная железа и крупный двуядерный цитон гиподермы. У обеих личинок полностью редуцирована выделительная система. Нервные системы упрощены до сопоставимого уровня. Генеративный материал в обоих случаях представлен недифференцированными клетками. Мы полагаем, что после метаморфоза эти мирацидии превращаются в похожих друг на друга материнских спороцист. Исследованная нами материнская спороциста *B. progenetica* проливает свет на функцию некоторых внутренних частей этих мирацидиев.

Данное исследование – первое, в котором приводится детальный ультраструктурный анализ метаморфоза «пассивного» мирацидия. Впервые описан необычный тип смены покрова: эпителиальные пластинки мирацидия *B. progenetica* сбрасываются, на поверхность формирующегося из гиподермальных гребней тегумента «выворачиваются» вакуоли, содержащие на своей внутренней поверхности маленькие микровилли. Нам удалось показать, что апикальная железа мирацидия *B. progenetica* сохраняется после метаморфоза личинки длительное время (более двух недель), вырабатывая секрет. Также длительное время после метаморфоза сохраняется крупный двуядерный цитон тегумента (гиподермы), а в возрасте двух недель материнская спороциста уже несет новые одноядерные цитоны тегумента. За две недели материнская спороциста *B. progenetica* существенно вырастает, увеличивая число соматических элементов, в том числе мышечных клеток. Формирование сомы спороцисты, как мы полагаем, осуществляется за счет пролиферации недифференцированных клеток и соответствующей дифференциации их потомков.

3.5.3 Мирацидии Opisthorchiata

Данное исследование – первое, в котором приводится ультраструктурное описание описторхиадного мирацидия. Полученная нами схема строения мирацидия *C. lingua* в точности совпадает с некоторыми светооптическими описаниями других личинок Opisthorchiata. Наши данные позволили корректно трактовать выявленные ранее структуры. Высокий уровень сходства личинок *Opisthorchis*, *Clonorchis*, *Metorchis* с описанным нами мирацидием *Cryptocotyle* говорит о консервативности строения мирацидия в рамках Opisthorchiata.

Основным выявленным сходством описторхиадных личинок является наличие трех крупных железистых элементов: двух цитонов гиподермы, залегающих в передней половине тела мирацидия, и крупной железы, проток которой огибает цитоны. Очень похожая организация желез характерна для мирацидиев Plagiorchiata (Schell, 1962; Dobrovolskij, 1965). Такое сходство может быть аргументом в пользу родства этих групп, но нельзя исключать, что этот признак мог возникнуть независимо в двух ветвях эволюции Digenea.

В целом, в строении мирацидия *C. lingua* отражено влияние тех же тенденций, которые мы наблюдали у других «пассивных» личинок. Эпителиальная формула сокращена до двух поперечных рядов (3+1). Отмечена редукция продольной мускулатуры до одной клетки – идентично мирацидию *Pr. squamatus* (Vucephalidae). Выделительная система представлена одним олигоцилиарным протонефридием – также аналогично *Pr. squamatus*. Нервная система редуцирована до «минимального» состояния, а генеративный материал представлен недифференцированными клетками. Так же, как и у других описанных нами «пассивных» личинок, все соматические элементы существенно редуцированы – все, за исключением аппарата проникновения. Последний специализирован, представлен особой комбинацией железистых клеток.

3.5.4 «Мирацидий» Notocotylidae

Полученные в ходе работы данные по строению яйца *P. alveatum* соотносятся с ранее опубликованными результатами Муррилла и др. (Murrills et al., 1985) по личинке *Notocotylus attenuatus*. Нам удалось определить природу оперкулярного тяжа – аппарата экстрезии «мирацидия», который оказался частью желточной мембраны яйца. Проникновение нотокотилидного «мирацидия» в кишечный эпителий моллюска осуществляется за счет «выстреливания» оперкулярного тяжа и пробивания им кишечного эпителия моллюска. Мы предполагаем, что именно появление «внешнего» аппарата проникновения сделало возможным полную редукцию соматических элементов «мирацидия», фактически сделав из него готовую, хоть и очень просто устроенную материнскую спороцисту. Под тегументом спороцисты лежат генеративные клетки: нам удалось обнаружить в их цитоплазме структуры типа «нуаж», что позволяет однозначно трактовать их природу. Мы предполагаем, что нотокотилидная материнская спороциста оказалась упрощена до такого состояния, что ее развитие (формирование новых соматических элементов) стало невыгодным или даже невозможным. По этой причине представители Notocotylidae стали использовать отличную от описанной нами для *B. progenetica* стратегию развития начальных этапов инвазии. Материнская спороциста *P. alveatum*, сома которой представлена исключительно двуядерным тегументом, существует в моллюске непродолжительное время. В отличие от материнской спороцисты *B. progenetica*, которая к двухнедельному сроку развития находится в фазе активного роста, спороциста *P. alveatum* на этом же сроке заражения готова лопнуть под давлением развивающихся в ней особой дочернего партеногенетического поколения – материнских редий. Таким образом, репродуктивный потенциал оказался смещен на дочернее и последующие партеногенетические поколения.

Заключение

Нами был проведен ультраструктурный анализ организации мирацидиев семи видов дигеней, использующих пассивную стратегию заражения первого промежуточного хозяина. Существование пассивной стратегии выявлено еще в конце 19-го века, сильное отличие «пассивных» мирацидиев от «активных» также определено довольно давно. Однако ранее не предпринимались попытки детального анализа морфофункциональных последствий смены стратегии заражения. Из-за методических сложностей работы с «пассивными» мирацидиями, эти объекты до нашего исследования были фактически не изучены на ультраструктурном уровне.

Нам удалось реконструировать строение мирацидиев из трех крупных филогенетических ветвей Digenea; полученные данные позволили сравнить организацию «пассивных» личинок с относительно хорошо исследованным «планом строения» «активных» форм. Такое сравнение позволило выявить основные тенденции эволюции мирацидиев после перехода к пассивной стратегии заражения первого промежуточного хозяина.

Нами подтверждена ранее отмеченная тенденция сокращения ресничного локомоторного аппарата «пассивных» мирацидиев. В разных группах дигеней происходит редукция эпителиальных пластинок и «тегументизация» покровов (Таблица 1 из диссертации). Исходя из этого, мы выдвинули предположение о том, что ресничная локомоция неэффективна в условиях вязкого содержимого кишки моллюска-хозяина.

Данное исследование позволило определить степень редукции нервной системы «пассивных» мирацидиев. При отсутствии необходимости поиска моллюска-хозяина сложная нервная система потеряла функциональную нагрузку и сократилась у «пассивных» мирацидиев до малоклеточного состояния (Таблица 1 из диссертации).

Пассивный образ жизни мирацидиев сделал возможной полную редукцию выделительной системы мирацидиев; у некоторых исследованных нами личинок она все же сохраняется, но в сильно сокращенном виде (Таблица 1 из диссертации).

Из всех клеточных систем «пассивных» мирацидиев наибольшего развития достигает аппарат проникновения, причем произошла его специализация к проникновению в кишечный эпителий моллюска. Нам удалось показать, что эта специализация привела к разнообразию устройства аппарата проникновения «пассивных» мирацидиев (Таблица 1 из диссертации).

Впервые удалось подтвердить на ультраструктурном уровне наличие недифференцированных клеток у «пассивных» мирацидиев. Мы предполагаем, что потомки этих клеток дифференцируются и в элементы сомы материнской спороцисты, и в генеративные клетки – эмбрионы дочернего поколения партенит.

Впервые произведен ультраструктурный анализ метаморфоза «пассивного» мирацидия представителя *Nemiurata*. Показано, что после заражения моллюска материнская спороциста длительное время развивается, наращивая число соматических элементов. В противоположность этому, в материнской спороцисте представителей семейства *Notocotylidae* сразу после заражения начинается интенсивное развитие особей дочернего поколения.

Выводы

1. Переход к пассивной стратегии заражения влечет за собой редукцию ресничного локомоторного аппарата, что, вероятно, связано с несоответствием ресничного способа локомоции условиям вязкого содержимого кишечника моллюска-хозяина.
2. Для мирацидиев *Hemiarata* характерно вооружение эпителиальных пластинок шипами, которые, предположительно, формируются на основе корешкового аппарата ресничек.
3. У «пассивных» мирацидиев отчетливо проявляется тенденция к редукции продольной мускулатуры.
4. Нервная система «пассивных» мирацидиев представлена малым числом клеток, что, по-видимому, стало возможным благодаря отсутствию необходимости ориентации во внешней среде и поиска моллюска-хозяина.
5. Выделительная система «пассивных» мирацидиев не несет значимой функциональной нагрузки, отчетливо выражена тенденция к полной редукции протонефридиев.
6. Генеративный материал «пассивных» мирацидиев в большинстве случаев представлен недифференцированными клетками, их деление и дифференциация происходит только после метаморфоза.
7. Организация аппарата проникновения «пассивных» мирацидиев значительно отличается от таковой «активных» личинок. Специализация к проникновению в кишечный эпителий моллюска протекала независимо в разных филогенетических ветвях Digenea, что привело к большому разнообразию устройства аппарата проникновения «пассивных» мирацидиев.
8. Подтверждено существование двух стратегий развития материнских спороцист, формирующихся в результате метаморфоза «пассивных» мирацидиев: длительное развитие спороцисты, которая постепенно наращивает соматические элементы (*B. progenetica*) (1) и наоборот, предельная редукция сомы материнской спороцисты при смещении морфогенетических процессов и репродуктивных усилий на дочернее и последующие партеногенетические поколения (*P. alveatum*) (2).

Список публикаций по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендуемых ВАК:

1. Смирнов П. А. Реконструкция строения мирацидия *Derogenes varicus* (Digenea: Derogenidae): первое ультраструктурное описание шипов на поверхности личинок *Hemiarata*. / П.А. Смирнов, Д.Ю. Крупенко // Паразитология. – 2023. – Т. 57, № 2. – Р. 108–123
2. Smirnov, P. A. Fine structure of a tiny gymnophalloid miracidium (Digenea) / P. A. Smirnov, A. A. Dobrovolskij // Journal of Morphology. – 2021. – Vol. 282, N 9. – P. 1374–1381.
3. Smirnov, P. A. Miracidium of *Steringophorus furciger* (Digenea: Fellodistomidae) and other passive *Bucephalata* larvae / P. A. Smirnov, A. Gonchar // Zoomorphology. – 2023. – Vol. 142, N 1. – P. 1–11.
4. Smirnov, P. A. What is hidden under an eggshell? Ultrastructural evidence on morphology of "passive" *Prosorhynchus squamatus* miracidium (Digenea: Bucephalidae) / P. A. Smirnov, A. A. Dobrovolski // Invertebrate Zoology. – 2019. – Vol. 16, N 4. – P. 361–376.

Публикации в прочих журналах, трудах, сборниках и материалах конференций:

5. Смирнов П.А. Морфология мирацидия *Gymnophallus* sp. (Trematoda: Gymnophallidae) / П. А. Смирнов // Современная паразитология – основные тренды и вызовы. Материалы VI Съезда Паразитологического общества: Международная конференция – Санкт-Петербург: Издательство «Лема» – 2018. – С. 227.