

*На правах рукописи*

**СОКОЛОВА**

**Юлия Яновна**

**БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ И  
БИОРАЗНООБРАЗИЕ МИКРОСПОРИДИЙ**

**03.02.11 – Паразитология**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Санкт-Петербург – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии наук

**Научный консультант:**

**Скарлато Сергей Орестович**

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, главный научный сотрудник

**Официальные оппоненты:**

**Слюсарев Георгий Сергеевич**

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», профессор кафедры зоологии беспозвоночных

**Новожилов Юрий Капитонович**

доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ботанический институт им. В.А. Комарова Российской академии наук, главный научный сотрудник

**Карпов Сергей Алексеевич**

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Зоологический институт Российской академии наук, главный научный сотрудник

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего педагогического образования «Российский государственный педагогический университет имени А.И. Герцена»

Защита состоится « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 002.223.01 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 « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Овчинникова Ольга Георгиевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность и степень разработанности темы исследования.** Микроспоридии (тип *Microsporidia* *Valbiani* 1882) (M)<sup>1</sup> – внутриклеточные облигатные паразиты животных, имеющие практическое значение для сельского хозяйства, ветеринарии и медицины. М вызывают нозематоз пчел, пембрину тутового шелкопряда, летальные энцефалиты при разведении млекопитающих, уничтожают популяции морских беспозвоночных, таких как креветки и крабы, паразитируют в промысловых видах рыб. Пример положительного с точки зрения человека значения М – снижение численности насекомых-вредителей сельскохозяйственных культур. Подавляющее большинство М – паразиты беспозвоночных (главным образом, членистоногих) и рыб. Вплоть до последней четверти 20-го века были известны лишь единичные случаи заболевания людей, однако эпидемия ВИЧ, разразившаяся в США и Европе в 1990-х годах, показала, что М – опасные оппортунистические паразиты человека, играющие существенную роль в формировании синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИДа). Описано более десяти видов М, паразитирующих у человека, и изучены возможности лечения и профилактики микроспоридиоза. Дальнейшие исследования показали, что роль М как оппортунистических опасных паразитов человека не сводится к проблеме СПИДа. Микроспоридии вызывают тяжелые осложнения у пациентов после пересадки органов, у онкологических пациентов и больных диабетом, у пожилых людей и детей, особенно в регионах с неблагоприятной эпидемиологической обстановкой. Природный резервуар микроспоридиозов – домашние и дикие животные, ассоциированные с человеком. В 2013 г. Американский центр по контролю за заболеваниями (CDC) и Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) включили М в список возбудителей опасных инфекционных болезней, передающихся через воду и пищу. Некоторые виды М насекомых при определенных условиях могут становиться оппортунистическими паразитами человека. Насколько широк спектр таких видов и чем определяется переход М беспозвоночных к паразитизму в млекопитающих, остается непонятным. Этому вопросу посвящен один из разделов диссертации. Также значительная часть работы посвящена не изученным ранее паразито-хозяйным системам, имеющим значение для хозяйственной деятельности человека.

Микроспоридии – возможно, самые распространенные эндобионты Metazoa: они встречаются практически во всех географических экотопах Земли, включая глубоководные термальные скважины, и известны из представителей большинства классов Metazoa, а также из некоторых инфузорий и грегариин. Как показывают метагеномные исследования, роль М в глобальных естественных биоценозах, таких как биоценоз мирового океана или тропического леса, существенно недооценена (Bass et al., 2018). Подавляющее большинство видов М непосредственно не связано с человеком и поэтому остается неизученным. Исследования по биоразнообразию М, не имеющих непосредственного практического значения, также представлены в диссертации и помогают восполнить этот пробел.

С точки зрения клеточной биологии, М интересны как пример крайней адаптации эукариотической клетки к паразитическому образу жизни, проявляющейся на клеточном,

---

<sup>1</sup>*Список часто встречаемых сокращений (остальные сокращения расшифрованы в тексте):* АГ, аппарат Гольджи; ВК, везикулярный кластер (тип тубулярной сети меронтов); ДК, диплокарион; ИЭМ, иммуноэлектронная микроскопия; М, микроспоридии; МСрДНК, ген малой субъединицы рибосомальной РНК; МСрРНК, малая субъединица рибосомальной РНК; МФ, макрофаги; ОТ-ПЦР, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; ПТ, полярный трубка; ПВ, паразитофорная вакуоль; СМ, световая микроскопия; СПИД, синдром приобретенного иммунодефицита; ТК, тубулярный кластер (тип тубулярной сети споронтов); ТС, тубулярная сеть; ЭМ, электронная микроскопия; ЭР, эндоплазматический ретикулум; ITS, Internal Transcribed Spacer, внутренний транскрибируемый спэйсер; MIN, Multilayered Interlaced Network, тип ТС спороплазм.

субклеточном и молекулярных уровнях. М обладают маленькими геномами с минимальным для эукариот количеством кодируемых белков и биохимических путей. Эти геномы могут быть относительно быстро и недорого отсекуены и изучены. В результате М оказались на переднем крае работ в области геномики и протеомики, так как фактически они представляют собой естественные клеточные модели для изучения минимальных физиологических потребностей эукариотической клетки, а также молекулярно-генетических взаимодействий между паразитом и хозяином. Обратной стороной увлечения геномикой и протеомикой микроспоридий стало снижение количества и качества публикаций по биоразнообразию, морфологии и таксономии микроспоридий. К сожалению, молекулярные биологи, которые сейчас определяют развитие биологии в целом и «микроспоридиологии» в частности, нередко недооценивают важность конкретной информации о биологии отдельных видов, в том числе и для интерпретации биоинформативных данных. В настоящее время доля не идентифицированных семейств генов, транскриптов и белков в изученных геномах, транскриптомах и протеомах значительно превышает долю генов с известными функциями (Keeling et al., 2014). При приблизительно одинаковом наборе основных рабочих генов, кодирующих существенные биохимические пути, размеры геномов варьируют от 2.3 Мб у паразита человека *Encephalitozoon intestinalis* до 51.3 Мб у *Edhazardia aedis* из М комаров. Самые интересные вопросы, на которые еще предстоит ответить микроспоридиологам: в чем причина таких радикальных различий в геномах и протеомах, как эти различия связаны с жизненными циклами, уровнем специфичности по отношению к хозяевам и тканям, когда и под давлением каких факторов утеряны кластеры генов и целые метаболические пути, т.е. как шла приспособительная эволюция М. Ответы на эти вопросы невозможны без подробного изучения биологии и цитологии разных групп М. При изложении собственных результатов, как и при обсуждении литературных данных, автором ставилась задача по возможности интерпретировать наблюдения «классической» морфологии и общей биологии М в контексте новейших успехов паразитологии, геномики и молекулярной биологии.

Важная проблема таксономии М, типичная в настоящее время и для систематики других групп живых организмов – переко́с в сторону приоритета «баркодинга» (фактическим «баркодом» видов микроспоридий признан участок МСрРНК, примерно 1200 пар оснований) в ущерб качественному морфологическому анализу. Безусловно, молекулярная филогения невероятно обогатила и «оплодотворила» систематику и таксономию М: выявила новые филогенетические связи, подтвердила другие и показала ложность третьих (Vossbrinck et al., 2014). При этом также, безусловно, необходим синтез морфологического и молекулярного подходов (Desjardins et al., 2015), и только их консенсус, учитывающий особенности жизненных циклов, систематическую принадлежность хозяина, местообитание и тканевую специфичность, позволит создать естественную систему микроспоридий. В работах по филогении отдельных видов (>30 видов, Таблица 1) и групп микроспоридий автором предприняты попытки объединить молекулярные, морфологические и экологические характеристики таксонов. В рамках этой проблемы важнейшим направлением исследований была молекулярная характеристика описанных ранее видов и их локализация на филогенетическом древе микроспоридий.

Среди значительного количества уникальных особенностей М (Williams et al., 2014), автором в сотрудничестве с российскими и зарубежными коллегами были впервые в мире целенаправленно изучены две ключевые черты клеточной биологии М, обеспечившие беспрецедентный успех группы в качестве внутриклеточных паразитов: (1) специфическая организация аппарата Гольджи и «минимальной» секреторной системы М, на базе которой сформировались основные компоненты аппарата экстрезии, и (2) способность М модулировать клеточный цикл хозяев, в частности, ингибировать апоптоз.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы – изучение многообразия клеточной организации и жизненных циклов микроспоридий, паразитирующих в хозяевах из различных систематических и экологических групп, для выявления морфологических коррелятов диверсификации микроспоридий и эволюционных адаптаций, которые обеспечили этим

паразитам необычайно широкое распространение среди животных почти всех типов, а также для разработки подходов к изучению микроспорициальных инфекций человека. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить строение и жизненные циклы представителей семейства *Metchnikovellidae*, базальной группы типа *Microsporidia*.

2. Изучить ультраструктуру, особенности внутриклеточного развития и филогенетические связи микроспорициев членистоногих, в том числе: (а) хозяйственно важных морских десятиногих раков (класс *Crustacea*: *Decapoda*) на примере *Agmasoma penaei*, *Perezia nelsoni* и *Apotasporea heleis*, (б) массовых пресноводных ракообразных – циклопов (*Crustacea*: *Cyclopoidea*) и дафний (*Crustacea*: *Cladocera*) на примере *Alfvenia sibirica* и *Agglomerata cladocera*, а также (в) насекомых (класс *Insecta*) различных отрядов на примере (i) представителей рода *Paranosema* – паразитов жирового тела прямокрылых (*Orthoptera*) и жуков (*Coleoptera*); (ii) *Liebermannia* spp., адаптированных к паразитированию в эпителиях кишечного тракта и его придатков кузнечиков (*Orthoptera*); (iii) вида *Kneallhazia solenopsae* из огненных муравьев *Solenopsis invicta* (*Hymenoptera*) со сложным полиморфным жизненным циклом, специализированным к паразитированию в колонии социальных насекомых; (iv) *Nosema disstriae* – паразита карантинного вредителя леса, *Malacasoma disstria* (*Lepidoptera*), типичного представителя самого распространенного рода микроспорициев *Nosema*.

3. Изучить распространение микроспорициев у рептилий и родственные связи *Encephalitozoon rogonae* с видами рода *Encephalitozoon*, патогенными для теплокровных.

4. Используя отработанные методики идентификации микроспорициев, изучить распространение микроспорициоза у ВИЧ-инфицированных пациентов Больницы им. Боткина, СПб, Россия; отработать и применить на практике методы диагностики микроспорициев человека, определить распространенность и идентифицировать виды у экспериментальной группы пациентов.

5. Изучить функциональную морфологию аппарата Гольджи микроспорициев как структурной основы для образования и дальнейшего совершенствования аппарата экстррузии – синапоморфии, обеспечившей распространение микроспорициев как внутриклеточных паразитов почти всех групп животных.

6. На клеточных моделях «микроспорициев *E. cuniculi* и *V. corneae* – культура макрофагов человека» получить экспериментальное подтверждение гипотезе об ингибировании апоптозного каскада клетки хозяина как универсального механизма патогенеза микроспорициоза.

**Научная новизна исследования.** Описано 12 новых видов и выделено 6 новых родов микроспорициев (*Apotasporea*; *Kneallhazia*, *Larssonia*, *Liebermannia*, *Mockfordia* и *Paranosema*); 30 сиквенсов депонированы в Генбанке. Впервые изучена специфическая организация «минимальной» секреторной системы М, на базе которой сформировались основные компоненты аппарата экстррузии. На примере М показано, что секреторная система эукариотической клетки может функционировать в отсутствие системы антероградного и ретроградного везикулярного транспорта. Впервые на клеточной системе с 2 видами М, патогенными для человека, методом количественного ПЦР с обратной транскрипцией проанализирована экспрессия 84 генов, связанных с регуляцией клеточного цикла, выявлены пути модуляции клеточного цикла микроспорициями и показана способность ингибировать митохондриальный сигнальный путь апоптоза клетки хозяина.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В диссертационной работе обобщены данные по клеточной биологии, эволюции и биоразнообразию М, накопленные за 3 последних десятилетия – впервые после трудов И.В. Исси (Исси, 1986, 1987). Материалы диссертации использованы в лекциях и практических занятиях Кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ и для подготовки следующих коллективных монографий: (1) «The Microsporidia and Microsporidiosis», ASM Press, Washington, 1990; (2) «Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты», Круглый Год, Москва, 2001; (3) «The Golgi Apparatus. State of the art 110 years after Camillo Golgi's discovery», Springer, Wien, 2008; (4)

«Microsporidia: Pathogens of Opportunity», Wiley & Sons, New York, 2014. Описанная в диссертации ультраструктура жизненного цикла *Paranosema locustae* и ее интерпретация вошли в учебник паразитологии “Foundation of Parasitology” (Roberts, Janovi, 2004; Schmidt, Roberts, Janovi, 2009, 2013) – базовый учебник паразитологии для университетов США.

Методики идентификации М успешно применены для диагностики микроспоридиозов и идентификации видов в экспериментальной группе пациентов Инфекционной больницы им. С.П. Боткина, СПб, Россия.

Описание новых родов и видов М, уточнение жизненных циклов, структурной организации клетки, а также выяснение филогенетического положения и эволюционных связей этих паразитов имеет собственную теоретическую ценность и важно для построения естественной системы М, а также оценки их роли в различных биологических сообществах. Изучение М насекомых, вредящих здоровью и хозяйственной деятельности человека, *Kneallhazia solenopsae* – паразитов огненных муравьев и *Nosema disstriae* – паразита кольчатого коконопряда, карантинного вредителя леса в Канаде и России, позволило разработать методы диагностики этих М и помогло оценить их роль в снижении численности хозяев. Изучение микроспоридии *Agmasoma penaei*, паразита креветок *Litopenaeus setiferus*, промышленно добываемых в Мексиканском заливе, выявило широкую распространенность инфекции в Луизиане (США) и необходимость ее диагностики и профилактики. Исследование функциональной морфологии аппарата Гольджи, начатое в рамках проекта, руководимого автором и поддержанного грантом ИНТАС (2000-2003 гг. «Structural organization of Golgi compartment in Microsporidians: one more example of a minimal secretory system?»), было пионерским и теоретически важным для изучения секреторного транспорта эукариот. Оно показало, что М представляют собой модель минимальной секреторной системы эукариотической клетки, перспективной для изучения общих вопросов физиологии и функциональной геномики внутриклеточного транспорта эукариот. Уникальность этой модели состоит, с одной стороны, в гипертрофии транс-компартамента Гольджи и его трансформации в основную органеллу клетки М на стадии споры (аппарат экстрезии), а с другой – в «минимизации» секреторного транспорта, выраженной, в частности, в элиминации эндосомального пути, везикулярного транспорта и O-гликозилирования. Сравнительное изучение влияния заражения двумя видами М на индукцию апоптоза в макрофагах и экспрессию генных кластеров, ответственных за регуляцию апоптоза, проведено впервые и показало подавление митохондриального сигнального пути апоптоза обоими видами при наличии видоспецифичных механизмов регуляции клеточного цикла хозяина. Эти исследования имеют важное теоретическое значение для понимания механизмов патогенеза микроспоридиоза, а также расширяют представления о многообразии ответных реакций макрофагов на инфекцию эукариотическими микробами.

**Практические рекомендации.** В результате исследований по диагностике микроспоридий человека разработаны и предложены клинические методы тестирования на микроспоридиоз, показанные для ВИЧ-инфицированных пациентов с симптомами «диарей неясной этиологии» и с пониженным титром т-лимфоцитов (число CD4 клеток <100). Микроспоридиоз в России ранее не идентифицировался. Также разработан экспресс-метод оценки зараженности колоний огненных муравьев микроспоридиями, который рекомендован и применяется для изучения распространенности *Kneallhazia solenopsae* и других видов микроспоридий муравьев.

**Методология и методы исследования.** В работе использован широкий спектр методов световой и электронной микроскопии, иммунной гисто- и цитохимии, а также биохимических и молекулярно-биологических подходов. Методы фиксации, очистки спор и выделения ДНК были специально разработаны для изучаемых паразито-хозяинных систем. Впервые применены метод лазерной микродиссекции с последующим анализом нуклеотидных последовательностей для изучения полиморфных жизненных циклов микроспоридий, а также метод иммобилизации ДНК микроспоридий человека на бумажных носителях.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

I. Диверсификация микроспоридий, как и других паразитов, в целом, следует за диверсификацией хозяев, а направления приспособительной эволюции представителей всех пяти филогенетических групп типа *Microsporidia*, изученных автором, определяются: (1) типом паразитируемой ткани; (2) жизненными циклами паразита, которые модулируются экологическими предпочтениями хозяина и реализуются с помощью присутствия (или выпадения) промежуточного хозяина, формирования спор различного строения, а также чередования морфотипов спор и типов развития; (3) местообитанием хозяина: так, для паразитов всесветно распространенных морских *Decapoda* свойственно менее дискретное видообразование, характеризующееся формированием «клинов» постепенно изменяющихся видов со слабо выраженными морфологическими и генетическими различиями.

II. Род *Encephalitozoon*, три вида которого патогенны для млекопитающих, включая человека, а два других – естественные паразиты рептилий, – это единственный род микроспоридий, имеющий историю паразитирования у позвоночных животных, в отличие от всех других родов микроспоридий, филогенетически связанных исключительно с беспозвоночными хозяевами.

III. Инвазионная трубка парамикроспоридий, манубриум мечниковеллид и совершенная полярная трубка высших микроспоридий, обеспечившая этой группе широкое распространение среди практически всех групп беспозвоночных животных, представляют собой ряд гомологичных органелл – дериватов транс-компартамента аппарата Гольджи. Белки микроспоридий секретируются и транспортируются с помощью тубулярных сетей, которые гомологичны Гольджи компартменту других эукариот и возникают *de novo* на последовательных стадиях жизненного цикла у спороплазм, меронтов и споронтов. Внутриклеточный транспорт осуществляется с помощью механизма прогрессивного созревания цистерн, без участия везикул, что хорошо соответствует редуцированному репертуару белков окаймленных пузырьков в геномах микроспоридий.

IV. Подавление митохондриального сигнального пути апоптоза и модуляция клеточных циклов зараженных клеток – базальные и универсальные механизмы патогенеза микроспоридий, выраженные в разной степени у разных видов. Именно выработка совершенного механизма подавления апоптоза фагоцитирующих клеток, целевых для *Encephalitozoon* spp., вероятно, позволила представителям этого рода перейти к паразитированию в высших позвоночных.

**Степень достоверности результатов.** Степень достоверности полученных данных определена статистическим анализом, воспроизводимостью экспериментов, использованием сертифицированных приборов и реактивов надежных производителей, а также сопоставлением полученных данных с данными других авторов, опубликованными в открытой печати, и с сиквенсами, депонированными в Генбанке. Кроме того, материалы, содержащиеся в диссертации, опубликованы в международных журналах, что подразумевает тщательное рецензирование статей экспертами перед публикацией. Материалы диссертации регулярно представлялись и оценивались экспертами на ведущих международных и российских форумах.

**Апробация.** Материалы диссертации были представлены на следующих российских и международных форумах: I и II Всероссийских съездах по защите растений (Санкт-Петербург, 1995, 2005); Всероссийской научной конференции «Взаимоотношения паразита и хозяина» (Москва, 1998); Всероссийском симпозиуме «Клеточная биология на рубеже 21-го века» (Санкт-Петербург, 2000); семинарах Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2005, 2010, 2016); Всероссийском Паразитологическом конгрессе (Санкт-Петербург, 2018); семинаре Лаборатории паразитологии Зоологического института РАН (Санкт-Петербург, 2018), а также на III, IV, VII, VIII, X и XII Международных совещаниях по оппортунистическим инфекциям (Кливленд, США, 1994; Туссон, США, 1996; Цинциннати, США, 2001; Хило, США, 2003; Бостон, США, 2007; Тэrrитаун, США, 2012); III и VII Европейских протистологических конгрессах

(Эльсинор, Дания, 1999; Санкт-Петербург, Россия, 2007); Объединенном совещании по микроспоридиям беспозвоночных и позвоночных хозяев (Ческе-Будеёвице, Чехия, 2004); XI Международном протозоологическом конгрессе (Зальцбург, Австрия, 2004); 37-м, 38-м, 42-м, 47-м, 48-м, 49-м и 50-м ежегодных Конгрессах по патологии насекомых (Хельсинки, Финляндия, 2004; Анкоридж, США, 2005; Парк-Сити, США, 2009; Майнц, Германия, 2014; Ванкувер, Канада, 2015; Тур, Франция, 2016; Сан-Диего, США, 2017); 52-м ежегодном Энтомологическом конгрессе (Солтлэйк-Сити, США, 2004); 57-м ежегодном конгрессе Американского общества тропической медицины и гигиены (ASTMH) (Новый Орлеан, США, 2008); 96-й конференции Американской ассоциации иммунологов (Сиэтл, США, 2009).

**Публикации.** Материалы диссертации отражены в 68 публикациях, из них 62 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, 2 – в других научных изданиях, входящих в перечень ВАК. Результаты работы доложены и опубликованы в тезисах более чем 30 международных и российских конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 278 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц и 53 сложных рисунка (>200 индивидуальных рисунков). Работа состоит из введения, пяти глав: (1) обзора литературы, (2) главы, описывающей материалы и методологию исследований и (3–5) 3-х глав, обобщающих результаты собственных исследований, а также списка литературы (484 источника) и Приложения, содержащего список работ автора по теме диссертации и дополнительный иллюстративный материал к главам №№ 3–5.

**Благодарности.** Я благодарю Ирму Викторовну Исси за советы, личный пример и поддержку на всех этапах моей карьеры и, в особенности, за критический анализ первого варианта диссертационной работы. Я благодарна моим коллегам и соавторам из Лаборатории микробиологической защиты растений ВИЗР, в первую очередь, В.В. Долгих, Е.С. Насоновой (в настоящее время – сотрудник Лаборатории цитологии одноклеточных организмов ИИЦ РАН) и Ю.С. Токареву, а также сотрудникам Группы по изучению клеточных мембран Е.С. Снигиревской и Я.Ю. Комиссарчику и коллективу Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН за поддержку и помощь. Специально мне хочется поблагодарить моего научного консультанта С.О. Скарлато за ценные советы по написанию и представлению материалов моей работы к защите. Из зарубежных коллег я особенно признательна А.А. Миронову и Г.В. Безноуссенко (Alexander Mironov и Galina Besnoussenko, Италия), Р. Энцероту (Rolf Entzeroth, Германия), Д. Фуксе (Jim Fuxa, США) и Е. Дидье (Elizabeth Didier, США), в лабораториях которых мне посчастливилось работать, а также К. Ланге (Carlos Lange, Аргентина) и Д. Кйеи-Поку (George Kyei-Poku, Канада).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Биология клетки, филогения и происхождение микроспоридий (Обзор литературы)

Глава состоит из двух разделов. В первом разделе рассматриваются современные представления о строении клетки микроспоридий (М) и обсуждаются актуальные проблемы клеточной биологии М, такие как структурные особенности и предполагаемые функции оболочки спор, физиология аппарата экструзии и механизма заражения клетки-хозяина, морфофункциональная организация органелл спороплазмы и внутриклеточных стадий – плазматической мембраны, ядерного аппарата и рудиментарных митохондрий («митосом»).

Второй раздел посвящен проблеме происхождения М и их эволюционным связям с другими эукариотами. По причине отсутствия митохондрий, лизосом, диктиосом аппарата Гольджи, а также прокариотной организации рибосомального цистрона ранее микроспоридий относили к древнейшим эукариотам, представителям ныне несуществующего супертаксона Archezoa. В настоящее время благодаря успехам филогенетики, филогеномики и метагеномики положение М как части клады Rozellomycota-Microsporidia, сестринского

таксона по отношению к царству Fungi внутри суперцарства Ophistoconta, более или менее определено, хотя вопросы о взаимоотношениях Microsporidia с Rozellomycota и Aphelida, а также о границах между этими группами остаются открытыми и требуют дальнейшего изучения с включением в анализ большего количества таксонов и генов (Toruella et al., 2018). Специальное внимание в обзоре литературы уделяется клеточной организации и филогении «переходных форм»: микроспоридио-подобных розелломикот родов *Paramicrosporidium* и *Nucleophaga*, базальной микроспоридии с митохондриальным геномом *Mitosporidium daphnia* и «примитивным» микроспоридиям семейств Metchnikovellidae и Chytridiopsidae.

Разнообразные адаптации М к внутриклеточному паразитизму и ускоренные темпы редуцированной эволюции генома, привели к потере морфологических, биохимических и даже молекулярно-генетических черт сходства М с предковыми формами, к утрате, модификации и смене функций метаболических путей и клеточных органелл. Поэтому идентификация и морфофункциональная характеристика клеточных компартментов, а также установление положения М на эволюционном древе эукариот оказалось нетривиальной задачей. В частности, до работ автора организация секреторного компартмента М и его связь с аппаратом экстрезии, развитие которого обеспечило процветание М как паразитов практически всех групп животных, оставались малоизученными. Исследования, выполненные в ходе подготовки диссертации, также заполнили пробелы в понимании связи структурных характеристик ряда групп М с их таксономическим положением, определяемым молекулярно-филогенетическим анализом. Эти работы позволили оценить размах вариабельности клеточной организации М на разных стадиях жизненного цикла и впервые в ходе прямых экспериментов подтвердить один из принципиальных механизмов воздействия патогена на клеточный цикл клетки хозяина – ингибирование апоптоза.

## **Глава 2. Объекты и методология исследований**

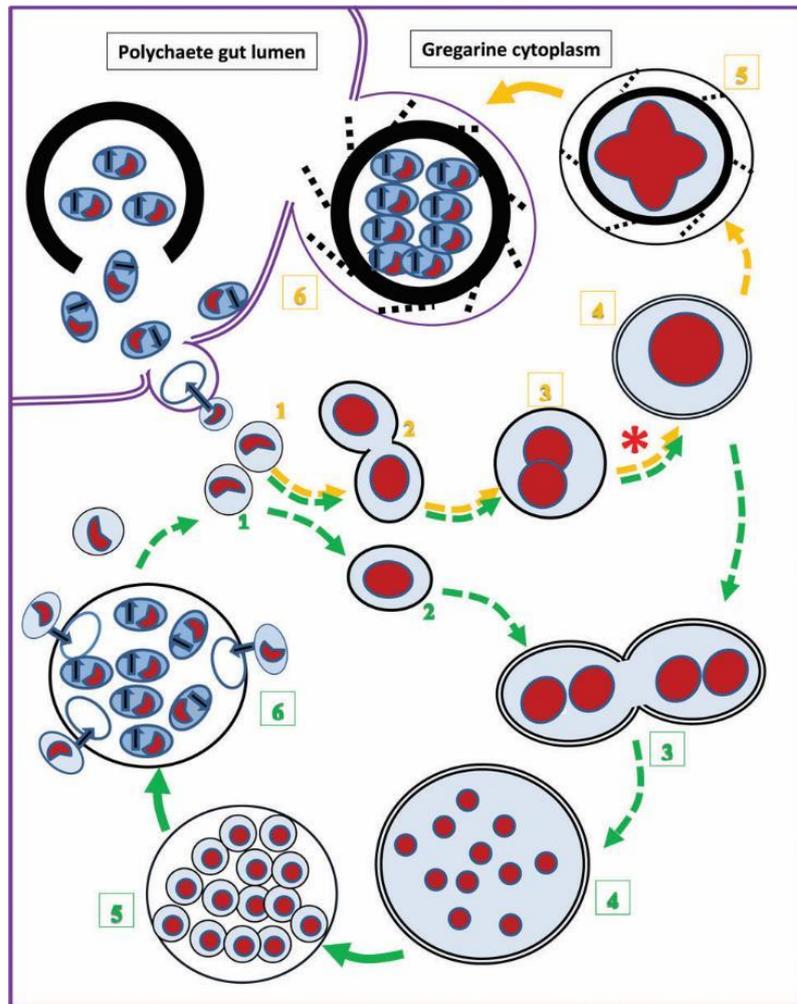
Список исследованных организмов включает *Paramicrosporidium* sp. (штамм KSL3) (Rozellomycota), мечниковеллид (*Rudimicrosporea* Sprague 1976) – гиперпаразитов полихет, а также собственно микроспоридий (*Microsporea* Sparague 1976), паразитирующих в разнообразных хозяевах (Табл. 1). Основным методом исследования был морфологический анализ, преимущественно на ультраструктурном уровне. В работе использованы также другие методы клеточной биологии, перечисленные ниже. В диссертации приведено их краткое изложение. (1) *Методы световой микроскопии*: флуоресцентная, конфокальная микроскопия, метод TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling); иммуноцитохимия на мазках и срезах, залитых в парафин, эпоксидные смолы и LR White; лазерная микродиссекция. (2) *Методы электронной микроскопии* (ЭМ): трансмиссионная (метод ультратонких срезов и негативный контраст) и сканирующая ЭМ; иммуно-электронная микроскопия методами пре-имбеддинга и пост-имбеддина с помощью мечения антителами, конъюгированными с наночастицами золота, на замороженных срезах (Tokuyasu technique) и на срезах, залитых в акриловые смолы LR White, LR Gold, Lowikryl. Методы фиксации для ЭМ включали рутинную химическую фиксацию, низкотемпературные фиксации (PLT и замораживания-замещения). (3) *Методы биохимии и молекулярной биологии*: спектрофотометрия, электрофорез, вестерн-гибридизация; выделение и очистка ДНК, ПЦР, ОТ-ПЦР. (4) *Методы длительного и кратковременного культивирования клеток и тканей*, а также культивирование микроспоридий в клетках и тканях. (5) *Разведение насекомых-хозяев*. (5) *Филогенетический/ кластерный анализ* (PAUP, MEGA, Mr.Bayes). *Анализ изображения и 3D реконструкции* (Image Pro, Photoshop, Reconstruct, Boston); EM3D (Stanford). *Статистические методы* (Statistica for Windows, Prism).

## **Глава 3. Цитология, жизненные циклы и филогения микроспоридий, паразитирующих в различных систематических и экологических группах хозяев**

Ультраструктура мечниковеллид (*Rudimicrosporea*, Metchnikovellidae) на примере двух видов рода *Metchnikovella* и особенности строения этих «низших» микроспоридий. В этой

главе впервые описывается ультраструктура *Metchnikovella incurvata* Caullery and Mesnil 1914, гиперпаразита грегариин *Polyrhabdina* sp., кишечного эндобионта полихет *Pigospio elegans*. Этот вид описан во Франции в начале прошлого века и идентифицирован автором в беломорских грегариинах из кишечника полихет. Наиболее важные результаты работы состоят в том, что с помощью серийных срезов показано строение заднего конца манубриума мечниковеллид, который разделён на сеть ветвящихся цистерн и трубочек, ранее описываемых как пузырьки, окружающие «манубриальную пластинку» (Sokolova et al., 2013). Полярная трубка мечниковеллид слабо развита, и эту сеть можно интерпретировать как предшественник дистального участка полярной трубки высших микроспоридий. Кроме того, из тех же хозяев автором описан новый вид рода, *M. spiralis*, и изучена его ультраструктура и жизненный цикл (Sokolova et al., 2014). В этом исследовании, помимо описания уникальной структуры цисты, наиболее интересным было обнаружение дикарионов в пролиферативных стадиях, предшествующих спорогонии. При изучении ультраструктуры мечниковеллид на срезах через периферийные участки паразитофорной вакуоли *M. spiralis* впервые выявлены характерные двойные мембранные профили, соответствующие по своей структуре и диаметру утолщённой части манубриума – срезы выброшенных полярных трубок, а в цитоплазме зараженных грегариин – спороплазмы и выстрелившие споры. Ультраструктурные данные указывают на то, что способ выброса зародыша-спороплазмы из споры у мечниковеллид сходен с таковым у высших М: спороплазма проходит через вывернутую полярную трубку, основанием которой служит структура, напоминающая якорный диск М. При этом аппарат экстрезии мечниковеллид развит слабее, чем у «высших» М, и служит для ре-инфицирования той же клетки хозяина и/или для попадания спороплазмы в грегариину из цист, разрушенных в кишечнике полихеты *M. spiralis* (Рис. 1). Для распространения мечниковеллид в популяции основного хозяина, т.е. от одной полихеты к другой, необходимо формирование толстостенных цист, защищающих спороплазмы от неблагоприятных условий внешней среды. У «высших» М в процессе эволюции стадия цисты элиминирована, а спора становится одновременно и стадией переживания, и стадией расселения. Эволюция аппарата экстрезии у высших М привела к (а) утолщению стенки споры, (б) развитию задней вакуоли для создания высокого внутриспорового давления и увеличения силы выброса полярной трубки (ПТ), (в) усовершенствованию якорного диска путём жёсткого соединения с ПТ для удержания основания ПТ внутри споры, (г) удлинению полярной трубки для увеличения «радиуса атаки» и (д) появлению полярнопласта для создания пула мембран, формирующих плазмалемму спороплазмы. Все эти структуры отсутствуют или слабо выражены у мечниковеллид. По своей морфологии спора *Metchnikovella* spp. более всего похожа на спору *Paramicrosporidium* spp. (Струтомусота) строением оболочки, орнаментацией экзоспоры, структурами, подобными манубриуму, и якорному диску, а также вытянутой или подковообразной формой ядра.

**Цитология, жизненные циклы и биоразнообразие микроспоридий, паразитирующих в морских и пресноводных ракообразных.** Ракообразные подтипа Crustacea – вторая группа хозяев после насекомых по многочисленности выделенных из них видов микроспоридий. Из приблизительно 200 родов М, 50 паразитируют в ракообразных, принадлежащих ко всем пяти классам этого подтипа (Malacostraca, Maxillopoda, Ostracoda, Branchiopoda, Cephalocarida) и обитающих в различных экологических нишах соленых, солоноватых и пресноводных водоемов – от паразитов рыб до свободноживущих обитателей глубоководных впадин. Доля изученных М ракообразных ничтожна, а их роль в водных экосистемах практически не исследована (Stentiford et al., 2013). Автором изучены М из ракообразных 3-х классов: Malacostraca (виды отряда Decapoda, семейств Caridea и Penaeidae), Maxillopoda (*Cyclops* spp. из п/кл Copepoda) и Branchiopoda (*Daphnia* sp. из отр. Cladocera).



**Рисунок 1.** Гипотетическая схема жизненного цикла *Metchnikovella spiralis*. Цифры в рамке – документированные стадии. Сплошные стрелки – наблюдаемые переходы между стадиями, прерывистые – гипотетические. Стадии спорогонии C1 подписаны зелёными буквами, C2 – жёлтыми. Полихета захватывает цисты мечниковеллид с пищей. В кишечнике циста растворяется, споры оказываются в контакте с грегариными. В грегарине спороплазма трансформируется в меронт (1, C1), растёт (2, C1), генерирует дополнительную оболочку и преобразуется в многоядерный спорогональный плазмодий (3, 4, C1), который распадается на споробласты (5, C1). Зрелые споры локализованы в паразитофорной вакуоли (6, C1). Споры C1 выпускают спороплазмы через вывернутые манубриумы. Затем паразит переходит к C2, т.е. формированию толстостенных цист со спорами. Предполагается, что у *Metchnikovella* spp. (как у *Amphiamblys* и *Amphiacantha*) гаметогамия (2, C2), дикариотическая стадия (3, C2), кариогамия (4, C2) и мейоз (звёздочка) происходят либо в самом начале C2, либо предшествуют разделению цикла на две спорогонии. Спорогональные плазмодии C2 делятся внутренним почкованием внутри толстостенных цист (5, C2). Цисты, содержащие зрелые споры, выходят из грегарины через разрыв пелликулы или с помощью экзоцитоза, когда мембрана паразитофорной вакуоли сливается с пелликулой грегарины.

Изучение *Agmasoma penaei* и *Perezia nelsoni*, паразитов промысловых креветок *Litopenaeus setiferus* семейства Penaeidae – древней группы морских Decapoda, выявило специфику видообразования у М, паразитирующих в морских беспозвоночных с всесветными ареалами. Сравнительный молекулярно-филогенетический и морфологический анализ, а также анализ распределения между видами хозяев показал, что изоляты *A. penaei* из разных

географических зон представляют собой клины близкородственных видов, слабо различающихся морфологически и генетически, но постепенно диверсифицирующихся среди креветок сем. Penaeidae (Sokolova et al., 2015). Это исследование также показало, что *A. penaei* сочетает в себе серию плезиоморфных признаков, в частности, деление споронта путем внутреннего почкования, анизофилярную полярную трубку и, предположительно, дву-хозяйный жизненный цикл (Pasharawipas, Flegel, 1994). Это хорошо согласуется с тем фактом, что хозяева этих М – представители сем. Penaeidae, базальной и древней группы Decapoda. *A. penaei* развиваются преимущественно в гонадах креветок, но ЭМ и молекулярно-филогенетический анализ показал, что мышцы *L. setiferus* заражены другим видом М, *Perezia nelsoni* Sprague (Sokolova, Hawke, 2016). Скорее всего, двойное заражение креветок неродственными М с различным тканевым тропизмом достаточно широко распространено, а инфекция мышц, которую предыдущие авторы приписывали *A. penaei*, в действительности обусловлена *P. nelsoni*.

**Таблица 1.** Систематическое положение животных-хозяев и №№ SSUrDNA сиквентов в Генбанке для видов микроспоридий, описанных или изученных автором

Вид М	Вид	Класс, отряд хозяина	№ в Генбанке	Источник
1	2	3	4	5
«Высшие» микроспоридии				
<i>Agglomerata cladocerae</i> +	<i>Daphnia magna</i>	Branchiopoda, Cladocera	KT950767	Sokolova et al., 2016
<i>Agmasoma penaei</i> +	<i>Litopenaeus setiferus</i>	Malacostraca, Decapoda	KF549987	Sokolova et al., 2015
<i>Alfvenia sibirica</i>	<i>Cyclops</i> sp.	Maxillopoda, Cyclopida	KT950766	Sokolova et al., 2016
<i>Anncaliia azovica</i>	<i>Niphargogammarus intermedius</i>	Malacostraca, Amphipoda	KY288064- KY288065	Tokarev et al., 2017
<i>Antonospora psocopterae</i>	<i>Xanthocaecilius sommermanae</i>	Insecta, Psocoptera	FJ865222	Sokolova et al., 2010
<i>Apotaspora heleios</i>	<i>Palaemonetes paludosus</i>	Malacostraca Decapoda	MG 708238	Sokolova, Overstreet, 2018
<i>Encephalitozoon pogonae</i>	<i>Pogona vitticeps</i>	Reptilia, Squamata	KR998311	Sokolova et al., 2016
<i>Heterovesicula cowani</i>	<i>Anabrus simplex</i>	Insecta, Orthoptera	EU275200	Sokolova et al., 2008
<i>Kneallhazia solenopsae</i>	<i>Solenopsis invicta</i>	Insecta, Hymenoptera	AF031538	Sokolova, Fuxa, 2009
<i>Larssonia obtusa</i> +	<i>Daphnia pulex</i>	Branchiopoda, Cladocera	AF394527	Видтман, Соколова, 1994;
<i>Liebermannia (Perezia) dichroplusae</i>	<i>Dichroplus elongatus</i>	Insecta, Orthoptera	EF016249	Sokolova et al., 2007
<i>Liebermannia covasacrae</i>	<i>Covasacris pallidinota</i>	Insecta, Orthoptera	EU709818	Sokolova et al., 2009
<i>Liebermannia patagonica</i>	<i>Tristira magellanica</i>	Insecta, Orthoptera	DQ239917	Sokolova et al., 2006
<i>Microsporidium phoronidi</i>	<i>Phoronis embryolabi</i>	Phoronida	n/s	Temereva, Sokolova. 2017
<i>Microsporidium</i> sp. 1 *	<i>Xanthocaecilius sommermanae</i>	Insecta, Psocoptera	FJ865221	Sokolova et al., 2010

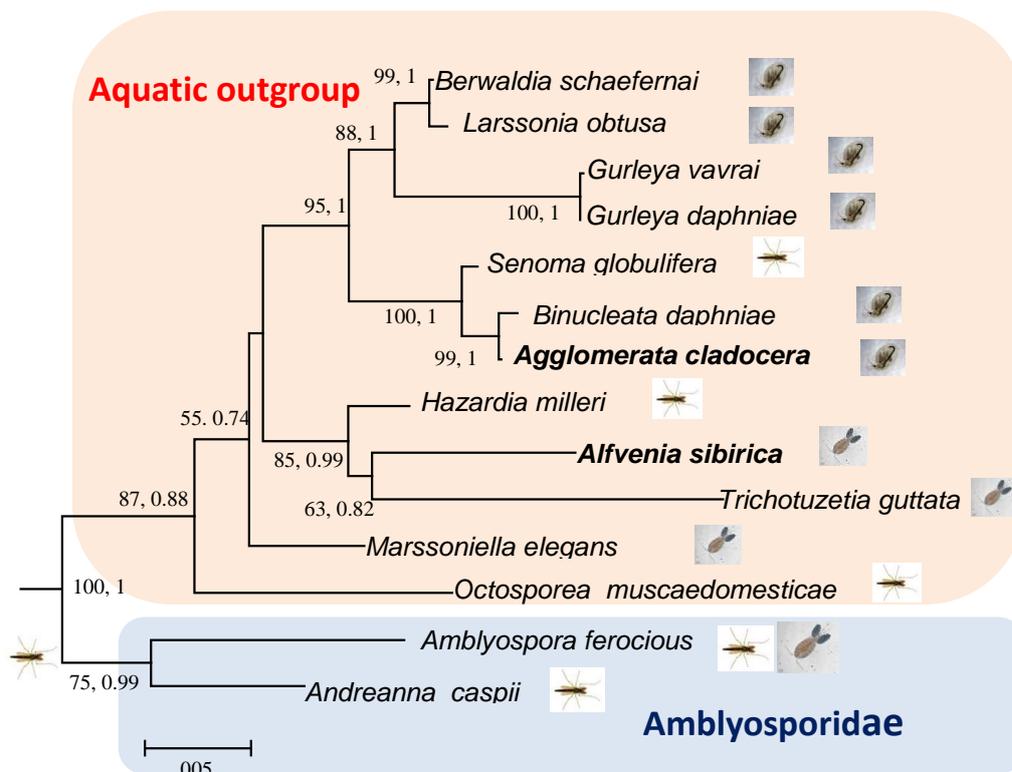
1	2	3	4	5
<b><i>Microsporidium</i></b> <b>sp. 4 *</b>	<i>Polypsocus</i> <i>corruptus</i>	Insecta, Psocoptera	FJ865224	Sokolova et al., 2010
<b><i>Mockfordia</i></b> <b><i>xanthoaceciliae</i></b>	<i>Xanthoacecilius</i> <i>sommermanae</i>	Insecta, Psocoptera	FJ865223	Sokolova et al., 2010
<i>Nosema bombi</i> +	<i>Bombus impatiens</i> , <i>B. sandersoni</i>	Insecta, Hymenoptera	GQ254295	Sokolova et al., 2010
<i>Nosema disstriae</i> +	<i>Malacasoma</i> <i>disstria</i>	Insecta, Lepidoptera	EU219085	Kyei-Poku, Sokolova, 2016
<i>Paranosema</i> ( <i>Nosema</i> , <i>Antonospora</i> ) <i>locustae</i>	<i>Locusta migratoria</i> , <i>Dichroplus schulzi</i> , <i>Schistocerca</i> <i>cancellata</i>	Insecta, Orthoptera	AY305324	Sokolova, Lange, 2002;
<i>Paranosema</i> ( <i>Nosema</i> ) <i>whitei</i>	<i>Tribolium</i> <i>castaneum</i>	Insecta, Coleoptera	AY305323	Sokolova et al., 2005
<i>Perezia nelsoni</i> + +	<i>Litopenaeus</i> <i>setiferus</i>	Malacostraca, Decapoda	n/s	Sokolova, Hawke, 2016
<i>Systemostrema</i> <i>alba</i> +	<i>Aeshna viridis</i>	Insecta, Odonata	AY953292	Sokolova et al., 2006
«Низшие» микроспоридии – метchnikовеллиды, гиперпаразиты морских полихет				
<i>Metchnikovella</i> <i>incurvata</i> +	<i>Polyrhabdina</i> sp./ <i>Pygospio elegans</i>	Apicomplexa, Gregarinosina/	n/s	Sokolova et al., 2013
<b><i>Metchnikovella</i></b> <b><i>spiralis</i></b>		Annelida, Polychaeta	n/s	Sokolova et al., 2014

Пояснения к Таблице 1. Ряды таблицы с ранее описанными видами, изученными автором с помощью ЭМ и молекулярного филогенетического анализа, выделены серой заливкой. Новые роды подчеркнуты, новые виды выделены жирным шрифтом. Знаком плюс (+) обозначены географические изоляты ранее описанных видов, которые были охарактеризованы автором. Звездочкой обозначены пока неописанные новые для науки виды, недостаточно охарактеризованные. N/s (no submitted), сиквенсы, не представленные в Генбанке.

Автором описан новый род и вид *Apotaspota heleios* из пресноводной креветки *Palaemonetes paludosus* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) – ключевого компонента биоценоза эстуарий рек в Мексиканском заливе, и изучена ультраструктура, биология и филогения этого вида. Гиподермальный эпителий и мускулатура креветок заполнены споронтами, споробластами и спорами, заключенными в спорофорные пузырьки (СП). ЭМ выявила диплокариотические меронты, которые после слияния ядер диплокариона трансформируются в материнские клетки с большим одиночным ядром. Плазмалемма меронта становится оболочкой СП, а ядро делится мейозом, за которым следуют митотические деления, сопровождаемые внутренним почкованием с образованием 4 споронтов, а затем 8 спор. Споры типичной ультраструктуры с изофилярной полярной трубкой, уложенной в 10-13 витков в 2-3 слоя. Филогенетический анализ на основе МСрДНК помещает новый вид на одну ветвь с двумя видами рода *Potaspota* – ксенома-образующими М из пресноводных окуневых рыб бассейна Амазонки (Sokolova, Overstreet, 2018). Данные автора, анализ литературы и филогенетический анализ, представленные в диссертации, свидетельствуют о существовании клады М, распространенной всесветно и известной в настоящее время из двух групп хозяев, костных рыб и креветок, обитающих в пресных или солоноватых водах. Группировка М рыб

и ракообразных позволяет предположить, что поликсенные жизненные циклы с участием рыб как промежуточных хозяев и креветок как окончательных, были в прошлом характерны для этой группы, а возможно, существуют и в наши дни, но пока не обнаружены.

Выявление и последующий ультраструктурный и молекулярно-филогенетический анализ двух видов *M.*, паразитирующих в *Daphnia magna* (Branchiopoda, Phyllozoa) и *Cyclops* sp. (Maxillozoa, Copepoda), собранных в Новосибирской области в районе реки Карасук, позволило впервые сопоставить ультраструктурные и молекулярные данные, а также выявить филогенетические связи между видами малоизученного, но многочисленного клада *M.* пресноводных беспозвоночных. Вид, выделенный из гиподермы и жирового тела циклопа, оказался новым и описан автором как *Alfvenia sibirica* (Sokolova et al., 2016). Второй вид выделен из тех же тканей дафний и идентифицирован как сибирский изолят (Si) вида *Agglomerata cladocera* (Pfeifer) (Larsson et al., 1996), описанного из *D. magna* из Англии. Основным результатом работы – молекулярная характеристика двух родов: *Alfvenia* (в настоящее время включает 3 вида) и *Agglomerata* (7 видов) и установление позиций этих родов на филогенетическом древе, в сочетании с ультраструктурным анализом стадий жизненного цикла изученных *M.* Автором также обобщены литературные данные по *Alfvenia* и *Agglomerata* spp. и представлен их сравнительный морфологический анализ. Эти два рода принадлежат к ветви, называемой «Aquatic outgroup» (Vossbrinck et al., 2004), сестринской группы по отношению к Amblyosporidae. Представители последней характеризуются сложными поликсенными жизненными циклами, проходящими в комарах и представителях отряда Copepoda. Филогенетический анализ, основанный на сиквенсе гена МСрРНК, и анализ специфичности по отношению к хозяевам показывают, что одно из направлений диверсификации в рамках этой группы связано со сменой хозяев с комаров на дафний в одной из анцестральных групп Amblyosporidae (Рис. 2).



**Рисунок 2.** Филогенетический анализ, основанный на сиквенсе гена МСрРНК, и анализ специфичности по отношению к хозяевам показывают, что диверсификация в рамках клады «Aquatic outgroup», к которой относятся изученные виды *Agglomerata cladocera* и *Alfvenia sibirica*, вероятно, связана со сменой хозяев с комаров на дафний в одной из анцестральных групп Amblyosporidae с поликсенными циклами (Sokolova et al., 2016).

**Ультраструктура, особенности внутриклеточного развития и филогенетические связи микроспоридий наземных насекомых.** Большинство родов и видов М описано из насекомых (Vecnel, Andreadis, 2014), а происхождение и диверсификация большинства групп М связаны с эволюцией и биоразнообразием этой группы Metazoa (Исси, 1976; Соколова, Исси, 2000). Кроме того, именно с М насекомых эволюционно и/или экологически связано большинство видов М, потенциально или реально патогенных для человека. В диссертации рассмотрены паразитарные системы М с участием насекомых трех отрядов – Orthoptera, Lepidoptera и Hymenoptera. Данные автора по М стрекоз (Odonata) и сеноедов (Psocoptera) не вошли в диссертацию, но были использованы либо в филогенетическом анализе, либо для сравнения при обсуждении результатов.

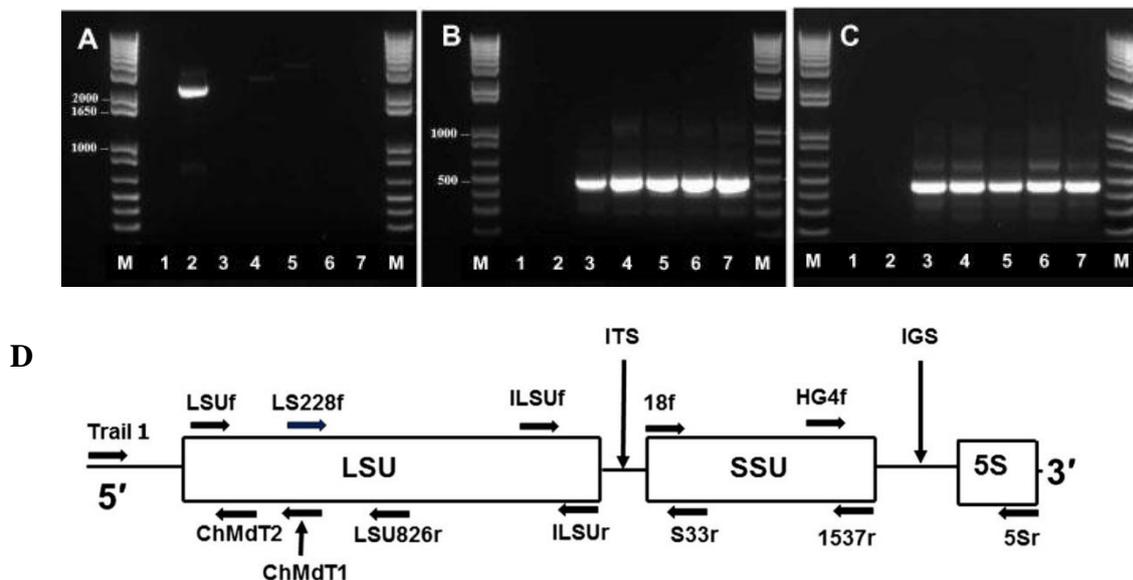
Микроспоридии рода *Paranosema* из клеток жирового тела прямокрылых и жесткокрылых насекомых. Из лабораторной популяции сверчков *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae), культивируемых в ИЭФиБ им. Сеченова РАН, описан новый вид М *Nosema grylli*, паразитирующий в жировой ткани и гемоцитах сверчков (Соколова и др., 1994). Позже, на основании молекулярно-филогенетического анализа выделен новый род *Paranosema*, в который также вошли *Nosema locustae* из перелетной саранчи *Locusta migratoria* и *N. whitei* из малого мучного хрущака *Tribolium confusum* (Sokolova, Lange, 2002; Sokolova et al., 2003; Sokolova et al., 2005). Паразито-хозяйинная система *P. grylli* – *G. bimaculatus* использована как модельная в Лаборатории микробиологической защиты растений ВИЗР, и по материалам ее изучения выполнено много публикаций и диссертаций, в том числе, диссертации В.В. Долгих (1996, 2017), Е.С. Насоновой (2007), П.С. Семенова (2004), Ю.С. Токарева (2003, 2016) и др. Весь жизненный цикл *P. grylli* проходит в непосредственном контакте с клеткой хозяина. Зрелые споры, 5 x 2.2 мкм (фиксированные 3.3 x 1.4 мкм) имеют овально-цилиндрическую форму, диплокарион и длинную полярную трубку, свернутую в споре в 15-18 витков в 1-2 слоя. Жизненный цикл этой микроспоридии включает слияние ядер диплокариана, половой процесс и кратковременную одноядерную стадию.

Микроспоридии рода *Liebermannia* – специализированные паразиты эпителиев кишечного тракта и его придатков. Выделена и изучена еще одна клад микроспоридий из аргентинских кузнечиков. Описан новый род *Liebermannia* с двумя новыми видами и уточнено систематическое положение третьего вида (Sokolova et al., 2006, 2007, 2009). Все три вида паразитируют в клетках кишечного тракта: *L. patagonica* – в клетках среднего кишечника кузнечика *Tristiria magellanica* (Tristitidae), *L. (=Perezia) dichroplusae* – в Мальпигиевых сосудах *Dichroplus elongates* (Melanoplidae) и *L. covasacrae* – в слюнных железах *Covasacris pallidinota* (Acrididae). Все три вида формируют мелкие (2.5-3.0 x 1.1-1.5 мкм) продолговатые споры путем деления веретеновидного спорогонального плазмодия. Сходство МСрДНК между видами – 97-99%. *L. patagonica* развивается в быстро обновляющихся клетках средней кишки, имеет короткий жизненный цикл и диплокарион (ДК) на всех стадиях. *L. dichroplusae* и *L. covasacrae* имеют в своем цикле мейоз и смену ядерных фаз и формируют одноядерные споры. *Liebermannia* spp. эволюционировали как специализированные паразиты кишечного тракта. Интересно, что адаптации *L. patagonica* к паразитированию в быстро обновляющихся и богатых пищеварительными ферментами клетках средней кишки (короткий жизненный цикл, выпадение полового процесса и окружение всех преспоровых стадий развития ЭР клетки хозяина) отсутствуют у двух других представителей этого рода.

Филогенетическое положение *Nosema disstriae* и диверсификация близкородственных М группы *Nosema bombycis*. *N. disstriae* – паразит лесного кольчатого коконопряда, карантинный вредитель в России. Для этого вида характерны регулярные вспышки численности, уничтожающие гектары лиственных лесов в Канаде (Nordin, Maddox, 1974). Мы впервые изучили ультраструктуру и филогению этого давно описанного вида и выяснили, что *N. disstriae* паразитирует во многих тканях, включая мышцы и жировое тело, но преимущественно локализуется в эпителии трахей (Куйе-Поку, Sokolova, 2017). Периодически наблюдается спорогония, заканчивающаяся формированием одноядерных спор в

паразитофорном пузырьке. В остальном морфология и ультраструктура этого вида типична для нозем из Lepidoptera. Для *N. disstriae* характерна реверсия генов РНК цистрона (5'–LSU–ITS–SSU–IGS–5S–3'), что говорит о принадлежности вида к кладе *N. bombycis* (Рис. 3). Филогении на основе генов RPB1, SSU-RPB1 and RPB1-LSU-ITS-SSUrDNA поддерживают базальное положение этого вида внутри клады *N. bombycis* (NbК) и группировку с *Nosema (Vairimorpha) anthereaeae*. Это исследование помогло разобраться с большой группой близкородственных видов, принадлежащих к роду *Nosema*, а также, опираясь на анализ литературных данных, позволило выделить следующие характеристики, которые, по мнению автора, позволили NbК стать одной из самых процветающих групп наземных М. (1) Широкое распространение альтернативных путей передачи инфекции способствует уменьшению роли рискованного перорального пути, а также ведет к селекции, направленной против продуцирования энергетически затратных октоспор, предназначенных для переживания в неблагоприятных условиях внешней среды. Транссексуальная, особенно трансвариальная, трансмиссия обеспечивает постоянное присутствие паразита в популяции хозяина и понижает риск перезаражения. (2) Биохимические адаптации к широкой тканевой специфичности, обычной среди всех представителей NbК, обеспечивают успешность колонизации хозяина независимо от сайта первоначального заражения. (3) Формирование тонкостенных «ранних» спор с короткими полярными трубками на начальных этапах заражения обеспечивают быстрое распространение и колонизацию хозяина за счет автоинвазии. Ранние споры наблюдались у многих видов NbК – у *N. bombycis* (Iwano, Ishihara, 1991a), *N. furnacalis* (Iwano, Kurtti, 1995) и *N. disstriae* (Kyei-Poku, Sokolova, 2017).

**Сложный жизненный цикл *Kneallhazia solenopsae* – пример адаптации к паразитированию в колониях огненных муравьев *Solenopsis invicta*, интродуцированных в США из Аргентины.** Жизненный цикл этой микроспоридии оказался столь же сложным, как и организация колонии муравьев (Sokolova, Fuxa, 2008). *K. solenopsae* продуцирует как минимум 4 типа морфологически различных спор. Принадлежность этих спор к одному виду доказана автором с помощью лазерной микродиссекции индивидуальных спор, выделения из них ДНК и сравнения продуктов ПЦР МСрДНК. Изучена морфология и ультраструктура



**Рисунок 3.** Определение последовательности субъединиц гена рРНК с помощью ПЦР. **Сверху:** ампликоны ПЦР в агарозном геле. **А.** Реакция с праймерами SS530F/580R, амплифицирующими типичный порядок генов РНК цистрона; **Б.** Реакция с праймерами ILSUF/S33R, амплифицирующими инвертированный порядок; **С.** Реакция с праймерами HG4f/5SR, инвертированный порядок. Дорожки: 1. Нет ДНК (контроль); 2. *Nosema thomsoni* (член *Nosema-Vairimorphra* клады с типичной организацией РНК цистрона); 3. *Nosema* sp.

FCW ex *Dioryctria abietivorella*; 4. *N. disstriae*; 5. *N. fumiferanae*; 6. *Nosema* sp. CO ex *Choristoneura occidentalis*, 7. *Nosema* CPP ex *C. pinus* (члены *N. bombycis* клады). **Снизу: Д.** Схема организации рРНК цистрона *Nosema* spp. Группы *Nosema bombycis* и праймеры для ПЦР.

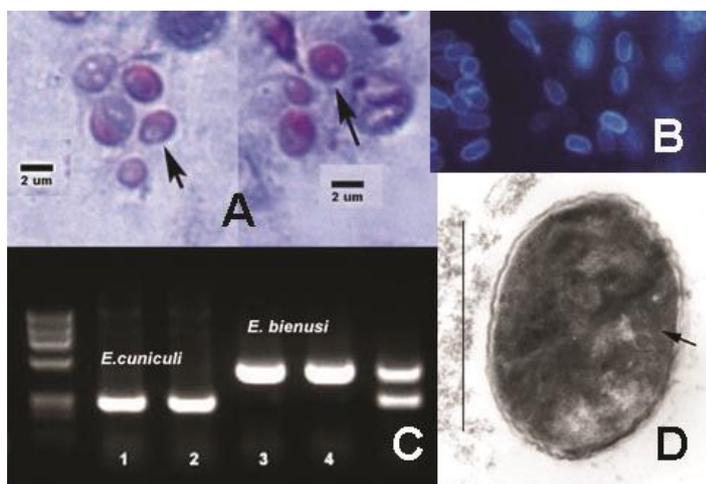
стадий мерогонии и спорогонии всех типов спор, а также их локализация в различных тканях и членах колонии. Диплокариотические (ДК) споры первого типа (ДКС1) развиваются только у личинок и куколок; октоспоры внутри спорофорных пузырьков – у взрослых рабочих особей, но никогда не встречаются в личинках; *Nosema*-подобные ДК споры 2-го типа (ДКС2) развиваются в жировом теле взрослых особей всех каст и служат для автоинвазии; мегаспоры, которые встречаются у личинок 4-го возраста, куколок и взрослых, выстреливают спороплазмы только в оплодотворенных (со сперматофорами) яичниках самок (королев). Переключение ДК части цикла на формирование октоспор и мегаспор отмечено после кариогамии частей диплокариона и последующего мейоза. Восстановление диплокариотичности происходит в результате слияния гамето-подобных одноядерных клеток, которое наблюдали в световой микроскоп на окрашенных ДАПИ препаратах. Октоспоры – самый массовый тип спор, служащий для переживания во внешней среде и горизонтальной передачи инфекции. Полиплоидные мегаспоры передают патоген трансвариально. От стадии яйца до личинки 4-го возраста заражение М выявляется только с помощью ПЦР. Спорогонии, ведущие к формированию ДК спор 1-го типа и мегаспор, запускаются на стадии личинок 4-го возраста, ключевого этапа в распределении пищи внутри колонии с помощью трофоллаксиса и играющего центральную роль в горизонтальном распределении спор внутри колонии. На основе морфологического и молекулярного анализов выделен вид *Thelohania solenopsae* Knell, Allan and Hazard 1977 в новый род *Kneallhazia* Sokolova and Fuxa 2009.

**Микроспоридии – паразиты позвоночных животных и человека.** Распределение микроспоридий по группам хозяев не равномерно. Из приблизительно 1400 описанных видов 70% паразитируют в беспозвоночных, 10% – в рыбах и амфибиях, и лишь около 1% обнаружены в пресмыкающихся и теплокровных (птицах и млекопитающих) (Vecsel, Andreadis, 2014).

**Микроспоридии рептилий: *Encephalitozoon pogonae* – новый вид микроспоридий из бородатой агамы *Pogona vitticeps*.** Диверсификация рода *Encephalitozoon* по позвоночным хозяевам и М рептилий крайне слабо изучены (Snowden, 2014). При этом изучение М рептилий важно для понимания эволюции и диверсификации видов, специализирующихся на паразитизме у позвоночных, особенно учитывая, что все три класса высших позвоночных, Reptilia, Mammalia и Aves, составляют одну эволюционную кладу и происходят от общего предка (Donoghue, Benton, 2007). В двух бородатых агамах *Pogona vitticeps*, погибших в результате многочисленных опухолей головы, конечностей и внутренних органов, с помощью световой микроскопии выявлены споры в макрофагах и очагах грануломатозного воспаления органов. На основании ультраструктуры, патогенеза и секвенирования участка (ITS-МСрДНК) рибосомального гена автором был описан новый вид *Encephalitozoon pogonae*, родственник *E. lacertae* и *E. cuniculi* (Рис. 4) (Sokolova et al., 2016). Исходя из анализа литературы по ветеринарии, можно предположить, что заражение *E. pogonae* наблюдалось и ранее, но патоген либо не был идентифицирован, либо обозначен как изолят *E. cuniculi*. Скорее всего, *E. pogonae* – обычный оппортунистический патоген рептилий, вызывающий заболевание у особей с ослабленной защитной системой. Все стадии *E. pogonae* развиваются в паразитофорной вакуоли. Общая морфология и внутриклеточное развитие *E. pogonae* похожи на другие виды *Encephalitozoon* spp. Идентификация нового вида еще раз подтвердила, что рептилии – естественные хозяева М рода *Encephalitozoon*. Таким образом, *Encephalitozoon* – единственный род М, диверсифицированный по группам позвоночных хозяев. Из 5 известных видов рода два вида (*E. lacertae* и *E. pogonae*) представляют собой специализированных паразитов рептилий; 3 рода (*E. cuniculi*, *E. intestinalis* и *E. hellem*) заражают птиц и млекопитающих, причем *E. hellem* в большей степени ассоциирован с птицами, *E. intestinalis*

– с человеком, а *E. cuniculi* – универсальный паразит теплокровных, но разделенный на генотипы (подвиды?). *E. romaleae* вторично перешел к паразитированию в насекомых, вероятно, с птиц (Sokolova, 2015). Все *Encephalitozoon* spp. из позвоночных вызывают сходную патологию – гранулематозное воспаление различных органов и диссеминированную инфекцию. Фагоцитирующие клетки, в первую очередь, макрофаги – первичный очаг инфекции, разносящие паразитов по всему организму.

Микроспоридии – реальные и потенциальные патогены человека. Первое выявление случаев микроспоридиоза среди больных синдромом иммунодефицита человека (СПИД) в России. Изучение биоразнообразия М и сравнительный анализ видов, паразитирующих в беспозвоночных и позвоночных животных, позволили показать, что роль М как паразитов человека в целом не велика. Она определяется оппортунистической природой М. При этом риск микроспоридиозов для людей с врожденными, приобретенными или конституциональными дефектами иммунитета нельзя недооценивать, особенно учитывая природную очаговость инфекции и постоянное (пропорциональное успехам медицины) расширение групп риска. Проведенное автором первое в России выявление М у ВИЧ-инфицированных пациентов Больницы им. Боткина в Санкт-Петербурге подтверждает это положение (Sokolova et al., 2011). Методами гистохимии (окраска Трихломом и Калькофлуором) и ПЦР М были идентифицированы в образцах стула 26 и 30 пациентов



**Рисунок 4.** Диагностика микроспоридий в образцах стула ВИЧ-инфицированных пациентов. А. Окраска трихромом мазков стула. Стрелки указывают на споры микроспоридий. В. Окраска калькофлуором (*E. intestinalis*, референтный образец, культур в ТНР-1). С. Дифференциация *Enterocytozoon bienusi* (ампликон 500 по) vs. *Encephalitozoon* spp. (300 по) с помощью ПЦР с MSP праймерами. D. Верификация инфекции в ЭМ: Спора *E. bienusi* из фекальных образцов. Стрелка указывает на витки полярной трубки, расположенные в несколько рядов, характерный признак споры *E. bienusi*. Масштаб, 1 мкм.

соответственно (18.9%) из 159 ВИЧ-инфицированных пациентов, обследованных на микроспоридиоз (Рис. 4). Неожиданной была более высокая распространенность *Encephalitozoon intestinalis* у 21 (12.8%) пациентов по сравнению с *Enterocytozoon bienusi*, выявленного только у двух пациентов (1.2%). *E. cuniculi* идентифицирован у трех пациентов; один изолят принадлежал к генотипу I, и два – к генотипу II. У одного пациента наблюдалась смешанная инфекция *E. intestinalis* и *E. cuniculi*. Статистически достоверных корреляций заражения с полом, возрастом и стадией СПИДа не выявлено, однако ВИЧ-инфицированные пациенты демонстрировали сниженное количество CD4+ Т-лимфоцитов (<100 кл/мкл крови) (P = 0.0116) и потерю веса (>10% от исходного уровня) (P = 0.0352) по сравнению с пациентами без микроспоридиоза. Это первое исследование, посвященное диагностике

микроспоридий у ВИЧ-инфицированных пациентов в России и первое обнаружение штамма *E. cuniculi* у человека.

Происхождение и филогенетические связи видов микроспоридий, паразитирующих у теплокровных животных и человека. Всего у человека за всю историю изучения выявлено 14 видов микроспоридий, большинство которых – единичные находки у людей с пониженным иммунитетом. Только 4 вида микроспоридий, относящихся к 2-м родам, могут считаться естественными паразитами млекопитающих: *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Enc. intestinalis* и *Enc. hellem*. Все эти виды считаются зоонозными инфекционными агентами и представляют собой угрозу для людей с ослабленной по различным причинам иммунной системой, в том числе для детей и пожилых людей. Другие виды М, как правило, паразиты членистоногих, случайны и выявляются у людей с серьезными нарушениями иммунитета. В то же время, находки этих случайных видов можно интерпретировать как последовательные этапы адаптации М к паразитизму в млекопитающих: от (1) транзитных сиквенсов М членистоногих, выявленных в стуле больных СПИДом (Sokolova et al., 2011), к (2) инфекциям кожи и подстилающих тканей, вызванных *Microsporidium* sp. (из группы *Endoreticulatus*) и *Tubulinosema* spp. у пациентов с ослабленным иммунитетом, (3) развитию *Vittaforma* spp. в иммунно-привилегированных нишах типа роговицы глаза, (4) поражению мышц микроспоридиями-«универсалами» типа *Trachipleistophora* spp. и *Anncaliia* spp., (5) специализированным инфекциям эпителия кишечника (*E. bieneusi*) и (6) системному микроспоридиозу, вызываемому *Encephalitozoon* spp. и *Enterocytozoon bieneusi*. Все виды М, обнаруженные у человека (за исключением последнего, чьи родственники паразитируют в морских Decapoda), ведут свое происхождение от микроспоридий насекомых или родственны им. Потенциальные источники микроспоридиальных инфекций человека, вероятно, связаны с «универсальными» паразитами насекомых, преадаптированных к варьирующим температурам (например, личинки комаров, развивающиеся в мини-водоемах при высокой температуре), и с широким спектром хозяев, а также с гиперпаразитами млекопитающих. Только представители рода *Encephalitozoon* и *Enterocytozoon bieneusi* сумели преодолеть температурный барьер и гуморальный иммунитет – два фактора, сдерживающие распространение М у теплокровных (Sokolova et al., 2010; Sokolova, 2016; Stentiford et al., 2016).

#### **Глава 4. Аппарат Гольджи и секреторный транспорт микроспоридий**

Особенности структурно-функциональной организации аппарата Гольджи микроспоридий по сравнению с другими эукариотами. В разделе кратко рассмотрены функции и происхождение аппарата Гольджи эукариот, а также морфологические и функциональные особенности этой органеллы у различных протистов. Подчеркивается, что у микроспоридий так же, как у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, других нехитридиевых грибов и еще некоторых групп эукариот, отсутствует «стаковая» организация Гольджи. Важно отметить, что ее отсутствие не мешает, в частности, дрожжам, иметь сходные с клетками млекопитающих механизмы внутриклеточного транспорта (Rambourg et al., 1995). У простейших родов *Mastigamoeba*, *Entamoeba* (Archamoebae), *Negleria* (Heterolobosea), *Giardia* (Diplomonadida), *Chilomastix* (Retortamonadida) стаки цистерн Гольджи также отсутствуют. Накопленные данные по физиологии, биохимии и геномике М позволяют сделать вывод о том, что секреторный транспорт играет важную роль в физиологии М в период их внутриклеточного развития. Он обеспечивает сортировку, модификацию и транспорт к сайтам конечной локализации (1) белков, секретлируемых в клетку хозяина для создания благоприятной для паразита среды обитания, (2) трансмембранных белков-переносчиков, модулирующих транспорт ресурсов хозяина для обеспечения паразита АТФ и другими молекулами хозяина, необходимыми для жизнедеятельности паразита, а также (3) белков аппарата экстрюзии (полярной трубки и полярного сака) и оболочки стадий спорогонии (Снигиревская и др., 2001; Соколова и др., 2003; Sokolova, Mironov, 2008; Williams et al., 2014).

Ультраструктурная организация тубулярных сетей (ТС) – аппарата Гольджи микроспоридий, и модификация ТС в ходе жизненного цикла. Задачей исследования было изучить организацию секреторного компартмента М на модельной системе *Gryllus bimaculatus* – *Paranosema (Nosema) grylli*, разработанной в ВИЗРе (Соколова и др., 1994; Dolgikh et al., 1995; Seleznev et al., 1995; Sokolova et al., 2003). С помощью комбинации методов стандартной электронной микроскопии (ЭМ), ультраструктурной цитохимии, трехмерной реконструкции серийных ультратонких срезов, а также электронной томографии толстых (150-200 нм) срезов автором впервые показано, что небольшие (300-900 нм) скопления округлых или овальных мембранных профилей 25-50 нм в диаметре, наблюдаемых в меронтах и споронтах вблизи цистерн ЭР и связанных с перинуклеарным пространством («везикулярные кластеры», ВК), представляют собой гомологи диктиосом аппарата Гольджи. Количество ВК на клетку варьировало от 1 до 8. Трехмерная реконструкция ВК показала, что каждый кластер состоит из двух частей. Первая часть представляет собой разветвленную сеть гладких тубул 30-45 нм в диаметре, вторая – менее разветвленную сеть трубочек с неравномерно утолщенными стенками, с минимальным диаметром 25 нм. В меронтах эти структуры немного мельче (300-700 нм), чем в споронтах (500-900 нм)). По-видимому, именно в везикулярных кластерах осуществляется сортировка и модификация белков, экспортируемых на пре-спорогональных стадиях развития М. Не исключено также, что часть белков экспортируется непосредственно из ЭР компартмента, минуя АГ, как это имеет место у других простейших и прокариот (Martí et al., 2003), так как слияния цистерн гладкого ЭР с плазматической мембраной периодически наблюдались на ультратонких срезах (Рис. 5). На последней преспорогональной стадии жизненного цикла *P. grylli* становятся заметны более крупные кластеры везикул, окруженные цистернами гладкого ЭР и также связанные с расширенными участками перинуклеарного пространства; это «тубулярные кластеры» (ТК). Количество ТК соответствовало числу ядер в клетке: на кратковременной стадии с четырьмя одиночными стадиями присутствовало четыре ТК, а в диплокариотических одноядерных споронтах – по одному ТК. На более поздних стадиях спорогонии ТК увеличиваются в размере, и тубулярная организация составляющих их мембранных профилей становится более заметной. В молодых споробластах ТК теряет связь с ядром, мигрирует к дистальному концу клетки и трансформируется в тубулярную сеть, дающую начало цистернам, в которых формируется полярный филамент (Рис. 5). Недавно на примере *Anncaliia algerae* было показано, что структура с функциями АГ присутствует и в спороплазме М: она также организована в виде ТС и в ней выявлены биохимические маркеры АГ (Takvorian et al., 2013). Подобная структура наблюдалась в спороплазмах *Kneallhazia solenopsae* (Sokolova, Fuxa, 2008). Таким образом, гипотетический АГ на всех стадиях жизненного цикла М организован в виде скоплений трубочек или ТС.

Морфофункциональные доказательства функций Гольджи у тубулярных сетей микроспоридий. Если ТС меронтов и споронтов представляют собой Гольджи-подобные структуры, то в них должны концентрироваться секреторные белки. Основные секреторные продукты микроспоридий – это белки полярного филамента (БПФ) и оболочки спор (БОС). С помощью поликлональных антител и иммунной электронной микроскопии на срезах зараженных тканей сверчка, залитых в LRWhite, и на замороженных срезах удалось показать, что БПФ начинают концентрироваться в тубулярных сетях поздних споронтов; в споробластах концентрация БПФ возрастает, и метка локализуется в цистернах с зачатками аппарата экстрезии. Метка исчезает из ТС по мере формирования структур зрелой споры, где она уже связана с ПТ. Белок экзоспоры р40 начинает накапливаться уже в ТС меронтов. Его концентрация возрастает у споронтов. В споробластах антитела к р40 концентрируются в периферической части ТС и в оболочке паразита, а у поздних споробластов и спор – исключительно в оболочке (Табл. 2).

Кроме того, автором показано, что *ТС содержат специфические маркеры АГ и обладают его цитохимическими функциями.* Для идентификации цис-АГ применили метод длительной осмиевой импрегнации (Novikoff, Goldfischer, 1961), приводящей к отложению нерастворимых оксидов осмия в просветах цистерн цис-Гольджи в результате взаимодействия

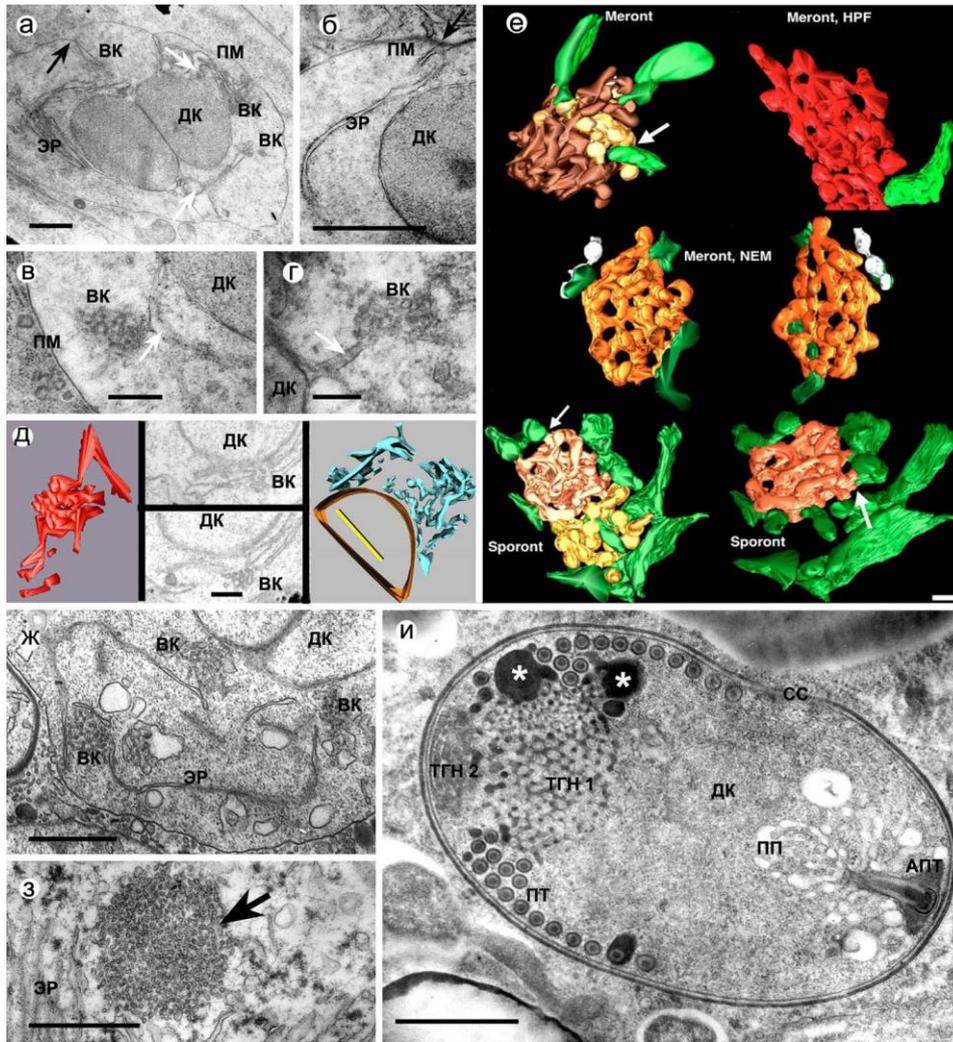
OsO<sub>4</sub> с альдегидными группами остатков сахаров, накапливающихся в этом компартменте. Показано, что участки перинуклеарного пространства, соединенные с цистернами ЭР, а также ВК, ТС и ТК меронтов и споронтов интенсивно окрашиваются «осмиевой чернью», а значит они гомологичны цис-Гольджи. Для идентификации транс-Гольджи применили метод окрашивания тиамин пирофосфатазой (ТПФ) (Takvorian, Cali, 1994). Локализации ТПФ в ТС, электронно-плотной глобуле и в мембранных контейнерах, содержащих белки ПФ в споробластах и спорах, говорит о том, что все эти компартменты выполняют функцию транс-Гольджи (Рис. 6). В то же время, ТПФ не была выявлена на ранних пролиферативных стадиях. Возможно, ферменты транс-Гольджи не задействованы в процессинге белков, секретлируемых на ранних стадиях жизненного цикла микроспоридий, а их модификация происходит на уровне ЭР и цис-Гольджи.

В ТС происходит гликозилирование белков полярной трубки и клеточной стенки. Ранее биохимическими методами было показано, что один из белков полярной трубки (РТР-56) сильно гликозилирован, а белок оболочки спор р40 связывается с манноза-специфичным GNA лектином, т.е. он модифицируется маннозил трансферазами микроспоридий (Dolgikh et al., 1995, 2005). Предполагается, что этот процесс должен происходить в Гольджи-подобном компартменте, т.к. по крайней мере одна из маннозил трансфераз ( $\alpha$ -1,2-mannosyltransferase) Гольджи-специфична, и ген этой трансферазы был выявлен в геноме микроспоридии *E. cuniculi* (Katinka et al., 2001). На замороженных срезах зараженного *P. grylli* жирового тела, обработанных маннозо-специфичным GNA лектином, конъюгированным с частицами коллоидного золота, показано, что метка выявлялась на оболочке спор, цистернах с ПФ и в тубулярной сети поздних споробластов (Beznoussenko, ..., Sokolova, Mironov, 2007; Sokolova, Mironov, 2008).

Наконец, опыты с иммуномечением на замороженных срезах показали, что в тубулярных сетях микроспоридий присутствуют резидентные белки АГ: антитела против Sec 13,  $\gamma$ СОР, GM-130 и джиантина локализуются в ТС меронтов, споронтов и споробластов. Это указывает на их цитохимическое соответствие цис-Гольджи компартменту (Рис. 7).

Опыты, подтверждающие отсутствие везикул в АГ микроспоридий. С помощью трехмерных реконструкций ультратонких срезов и методом электронной томографии автором показано, что Гольджи-подобные структуры как ранних, так и поздних стадий жизненного цикла микроспоридий представлены ТС. Эти ТС соединены с перинуклеарным пространством, эндоплазматическим ретикуломом, плазматической мембраной и контейнером, содержащим ПФ. Везикул не обнаружено даже при экспериментальном ингибировании слияния мембран фактором NEM (N-ethylmaleimide, блокирует SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor)-зависимое слияние везикул), или флуоридом алюминия (AlF<sub>4</sub>, блокирует «раздевание» СОР-1 везикул). Таким образом, сделан вывод об «авезикулярном механизме» функционирования аппарата Гольджи микроспоридий.

Уроки геномных проектов. У М сохранены основные кластеры генов, обеспечивающие системы ко-трансляционной транслокации полипептидов в просвет ЭР, внутриклеточный транспорт и экзоцитоз (Sec 61, Sec62, Sec63 и Hsp70 (Slamovits et al., 2006), имеются гены "сигнальных комплексов узнавания" (signal recognition particle, SRP54 and SRP19) и рецептора к этим комплексам, который узнает белки, предназначенные для транслокации в ЭР. Обнаружена также Sec11-подобная сигнальная пептидаза, которая катализирует отщепление N-терминальной сигнальной последовательности транслоцируемых белков. В геноме *E. cuniculi* выявлен ген дисульфид-изомеразы, участвующей в свертывании белков в ЭР.



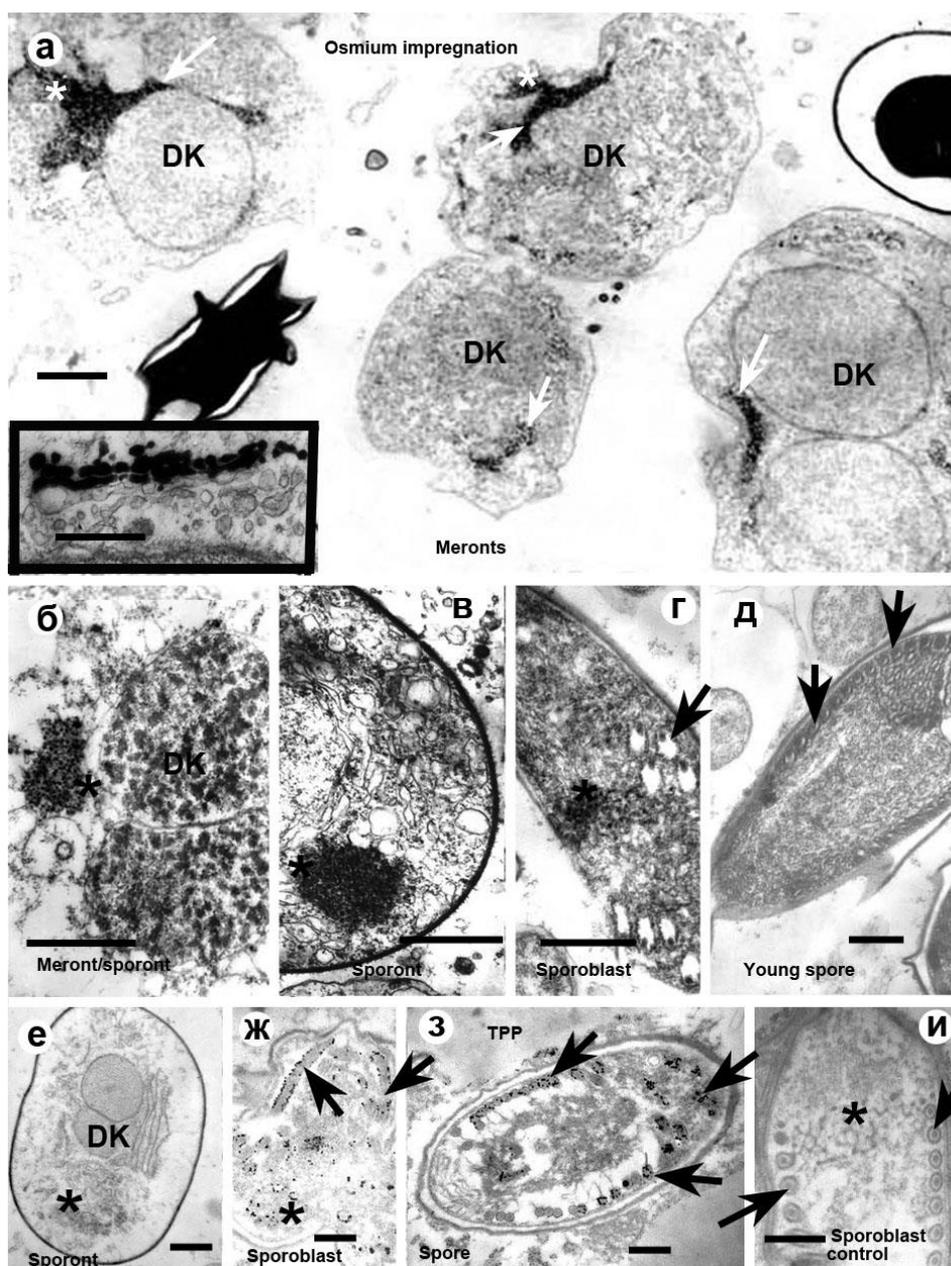
**Рисунок 5.** Ультраструктурная организация секреторного компартмента *Paranosema grylli*. а-г. Элементы секреторного компартмента зрелых меронтов, выявленные на толстых (150-200 нм) срезах при ускоряющем напряжении 200 кV. **а.** В поле зрения 3 везикулярных кластера (ВК). ВК соединены с перинуклеарным пространством (белые стрелки) и с плазматической мембраной (ПМ) (черная стрелка). **б.** Черная стрелка указывает на соединение эндоплазматического ретикулума (ЭР) с ПМ. **в, г.** Контакты ВК с ЭР (белые стрелки). **д.** Реконструкция ВК (в 2-х проекциях) по 20 серийным 80-нм срезам. В центре крайние срезы серии. **е.** 3-х мерная реконструкция виртуальных срезов через ТК меронтов и споронтов (ЭМ томография). HPF, метод «замораживание под высоким давлением-замещение». NEM, меронты предварительно обработаны агентом, блокирующим формирование везикул. Все ВК – это непрерывные тубулярные сети (ТС), разделённые на гладкие (коричневые и красные) и варикозные (жёлтые) участки. Места соединения ТС с ЭР (зелёные) указаны стрелками. **ж-и.** Фиксация восстановленным осмием и танниновой кислотой. **ж.** ВК меронтов – скопления мембранных профилей 20-40 нм в диаметре. **з.** Меронт-споронт промежуточной стадии с крупным ТК (стрелка), в дальнейшем он трансформируется в ТС, формирующую полярную трубку (ПТ). **и.** Транс Гольджи споробласта представлен (а) ТС, с гладким (ТГН1) и варикозным (ТГН2) участками, (б) свёрнутой под оболочкой споробласта цистерной, содержащей ПТ, и (в) контейнер с зачатком полярного диска и апикальной частью ПТ (АПТ). Этот контейнер связан с зачатком полярнопласта (ПП). Звёздочкой отмечены электронно-плотные гранулы, содержащие белок ПТ; ДК, диплокарион. Масштаб: **а-б,** 250 нм; **в-е,** 100 нм; **ж-з,** 500 нм; **и,** 1 нм.

**Таблица 2.** Плотность частиц золота, связанных с антителами против белка оболочки спор P40 и белка полярной трубки РТР А в мембранных структурах различных стадий микроспоридий

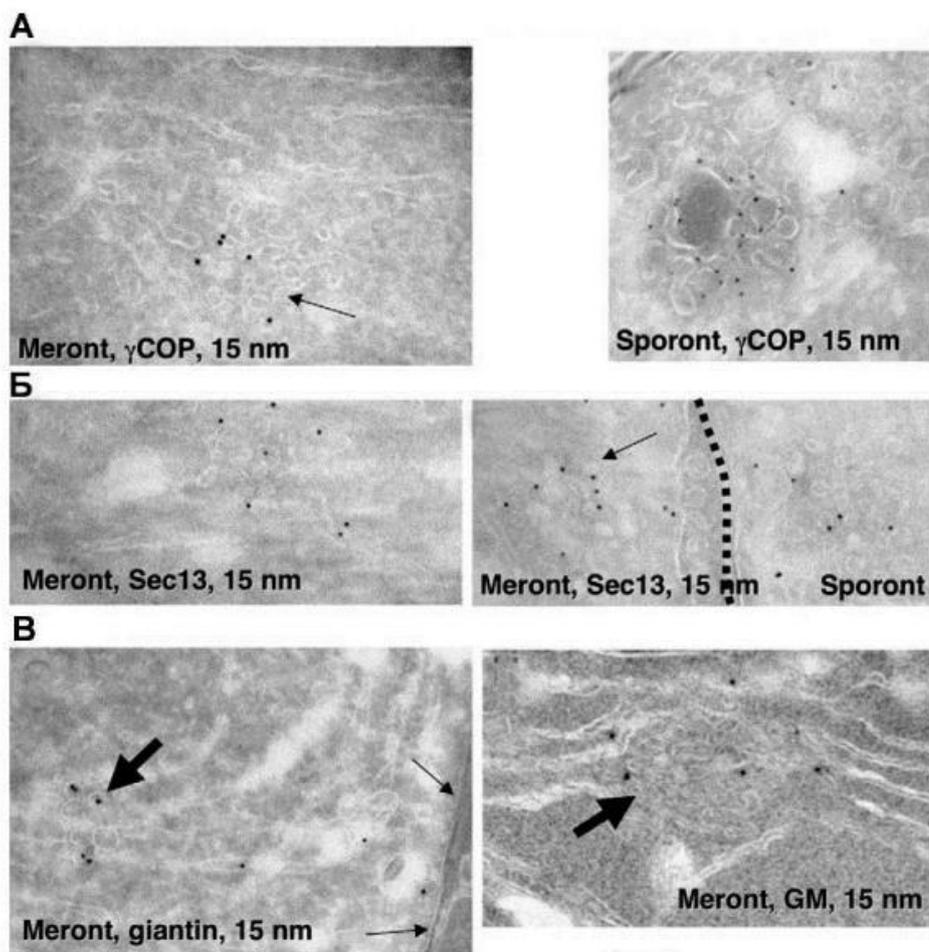
Белок (n)	Плотность мечения (% ЭР ± СО)			
	ЭР, меронт	ВК, меронт	ПМ, споронт	ПТ, споробласт
<b>P40 (31)</b>	100±21	298±40*	657±72*	--
<b>РТР А (29)</b>	100±25	--	432±63*	1254±67*

n, число анализированных везикулярных кластеров (ВК); -- нет результатов; ЭР, эндоплазматический ретикулум; ПМ, плазматическая мембрана; ПТ, полярная трубка; СО, стандартная ошибка. Данные нормализованы относительно средней плотности мечения цистерн ЭР, взятой за 100%. \*значение достоверно отличается от значения метки в ЭР.

Характерно, что у М полностью потеряны гены N-гликозилирования, которое у других эукариот происходит в просвете ЭР. Из 6 белков SNARE в изученных геномах микроспоридий присутствуют два R-SNAREs (SNC2 и синаптобревин) и четыре Q-SNAREs (syntaxin 5, VAMP, Bos1 и Vti1). SNARE-белки М и дрожжей очень похожи, однако у М их всего 6 (у *S. cerevisiae* – 26) (Burri, Litgow, 2004). Механизм, ответственный за разборку SNARE комплексов, представлен только одним белком Sec18, а белки, гомологичные SNAP-ам, вовсе не обнаружены. Это означает, что, вероятнее всего, система SNARE у микроспоридий работает, но медленнее, чем у дрожжей и млекопитающих. Минимальный набор белков семейства Rab (Ypt1, Rab1b, Rab5, Ytp6, Rab10, Rab-GDP) присутствуют в геномах М. Вместо 7 субъединиц коаномерного комплекса COP I, типичных для клеток млекопитающих, растений и дрожжей, у М присутствует только 6 субъединиц COP I. Epsilon (ε)-COP, ответственный за генерирование пузырьков, окаймленных COP I, отсутствует в геноме всех изученных М. С другой стороны, у М присутствуют все 4 известные субъединицы коаномерного комплекса COP II: Sec13, Sec23, Sec24 и Sec31. Есть белок Sar1p, необходимый для инициации сборки коаномерного комплекса COP II, но при этом отсутствует Sar1 (guanine nucleotide exchange factor). И наконец, у всех изученных «высших» М отсутствуют гены, кодирующие клатрин и сопутствующие белки-адаптины, что связано с полной утратой М лизосомной системы и системы эндоцитоза. Интересно, что у мечниковеллиды *Amphiamblys* sp., представителя «низших» М, выявлены гены, кодирующие некоторые белки (Clathrin heavy chain, Sla2/HIP1R, Las17/WAS, Epsin, Sla1, Arp2/3), необходимые для формирования клатриновых пузырьков (Mikhailov et al., 2017). Таким образом, мечниковеллиды представляют собой промежуточный этап в элиминации эндоцитозной части секреторного пути, утерянной полностью у «высших» микроспоридий. В геномах всех изученных микроспоридий выявлено только три гена, ответственных за O-манилирование белков, и не обнаружено ни одного компонента системы N-связанного гликозилирования (Williams et al., 2014). Из анализа геномных и протеомных данных следуют два основных вывода, подтверждающие исследования морфофункциональной организации АГ микроспоридий. Во-первых, М используют базовые механизмы секреторного транспорта эукариот, характерные для клеток дрожжей и млекопитающих. При этом отличительная черта секреторных механизмов клеток М заключена в значительной редукции отдельных элементов внутриклеточного транспорта, включая эндоцитоз. Во-вторых, анализ репертуара генов М, вовлеченных во внутриклеточный транспорт, свидетельствует о минимальной роли окаймленных пузырьков (Sokolova, Mironov, 2007).



**Рисунок 6. Цитохимические маркеры цис-Гольджи (окраска осмиевой чернью, рис. а-д) и транс-Гольджи (окраска тиамин пиррофосфатазой (ТПФ, рис. е-и) идентифицируют различные ТС микроспоридий. Участки перинуклеарного пространства, соединённые с ЭР (белые стрелки), везикулярные кластеры (белые звёздочки) и тубулярные кластеры (черные звёздочки) меронтов и споронтов окрашены осмием. Витки полярной трубки (черные стрелки), а также другие структуры в поздних споробластах и спорах не окрашены (д). В чёрной рамке положительный контроль: импрегнация цис-Гольджи адипоцитов сверчка. ТПФ не выявлена в споронтах и меронтах (е), но присутствует в ТС и в мембранных контейнерах с ПТ (черные стрелки), в споробластах и спорах (ж, з). и, отрицательный контроль (без субстрата). Масштаб, 500 нм.**



**Рисунок 7.** Иммунолокализация резидентных белков цис-Гольджи: Sec 13 (COPII), Sec 21(=γCOP, COPI), giantin и GM-130 в тубулярных сетях (ТС) *P. grylli*. **А.** Антитела к Sec21 связывались с ТС меронтов, споронтов и, в меньшей степени, споробластов. **Б.** Антитела к Sec 13 метили ТС меронтов и споронтов. **В.** Антитела против джигантина и GM-130 локализовались с ТС меронтов и, в меньшей степени, с ТС других стадий. Масштаб: **А, Б**, 100 нм; **В**, левый снимок, 180 нм; **В**, правый снимок, 120 нм. 15 nm, размер частиц коллоидного золота.

Микроспоридии как естественные экспериментальные системы для изучения секреторного транспорта. В этом теоретическом разделе кратко рассматриваются основные модели секреторного транспорта эукариот – в частности, везикулярно-матурационная гипотеза секреторного транспорта. В 1998 году впервые было показано, что внутриклеточный транспорт крупных агрегатов проколлагена в фибробластах не требует участия антероградных (COP II) везикул (Bonfanti et al., 1998). Впоследствии автором диссертации было выдвинуто предположение о том, что М с их мощным аппаратом экстррузии, формируемым внутри гипертрофированной цистерны Гольджи, вероятно, также представляют собой наглядный пример секреторного транспорта путем «созревания цистерн». При этом простота идентификации основного «карго» – белка полярной трубки, мелкие размеры и редуцированный набор биохимических путей делают микроспоридий удобной моделью для изучения отдельных аспектов внутриклеточного транспорта, подобно некоторым другим протистам (Соколова и др., 2007). Существует несколько базовых гипотез везикулярного транспорта и десятки их вариаций (Grasse, 1957; Palade, 1975; Mironov et al., 1997, 2001, и др.). Организацию аппарата Гольджи у микроспоридий лучше всего объясняют моделью латеральной диффузии (Beznoussenko, Mironov, 2002) и моделью быстрой компарментализации (rapid partitioning model) (Patterson et al., 2008). На микроспоридиях

впервые для эукариот продемонстрирована возможность транспорта белков на различных этапах секреторного пути при полном отсутствии везикул, теоретически предсказанная этими моделями.

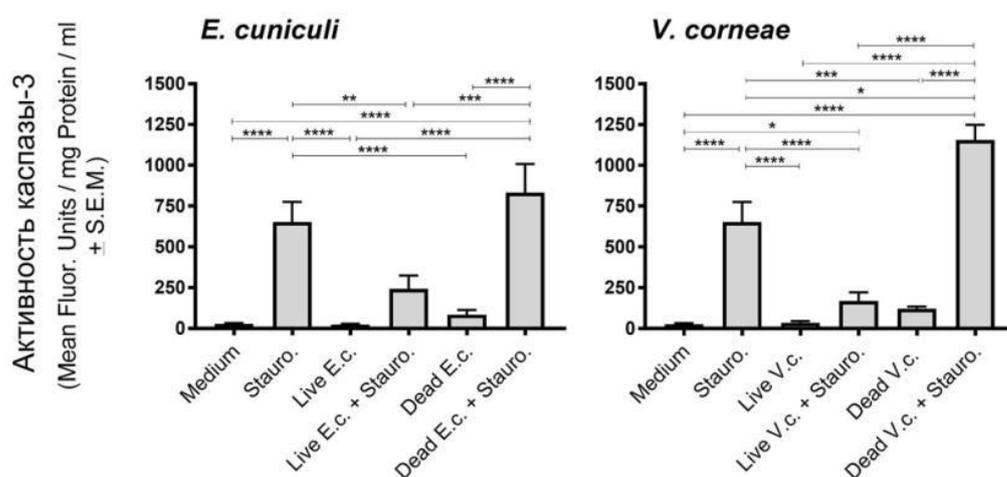
## Глава 5. Модуляция апоптоза клетки хозяина как механизм патогенеза микроспоридий

Гипертрофия и удлинение срока жизни зараженных М клеток, отмечаемые многими авторами, позволяют предположить, что М, подобно другим паразитам, способны модулировать клеточный цикл хозяина и подавлять апоптоз. Например, характерной особенностью паразитизма М в насекомых и рыбах является образование гигантских клеток, которые обеспечивают защищенные ниши для развития паразитов (Issi, 1986; Lom, Dykova, 2005; Sokolova et al., 2005). Ингибирование отдельных проявлений апоптоза и модуляция клеточного цикла хозяина ранее были продемонстрированы на нескольких клеточных и естественных системах с участием микроспоридий *Anncaliia algerae* (Scanlon et al., 1999), *Encephalitozoon* spp. (Scanlon et al., 2000; del Aguila et al., 2006), *Nosema bombi* (He et al., 2005), *N. ceranae* и *N. apis* (Highes et al., 2013; Kurze et al., 2015, 2016; Huang et al., 2016; Martin-Hernandes et al., 2017). Представленное в диссертации исследование – первая попытка сравнительного изучения модуляции апоптоза макрофагов двумя видами микроспоридий (Sokolova et al., 2018). Ранее на экспериментальных системах никогда не изучалось влияние микроспоридий на экспрессию комплекса генов, связанных с регуляцией апоптоза. Макрофаги (МФ) – первичные медиаторы врожденного неспецифического иммунитета, первая линия защиты от внутренних паразитов у беспозвоночных и позвоночных животных, а также координаторы гуморального иммунного ответа высших позвоночных. Апоптоз инфицированных МФ приводит к высвобождению паразитарных антигенов и является универсальным механизмом, помогающим как устранить инфекцию, так и вызвать гуморальный ответ на чужеродные антигены после смерти МФ с помощью систем репрезентации антигенов. Для *Encephalitozoon* spp. способность заражения МФ и размножения в них – ключевой фактор в диссеминации инфекции и развитии микроспоридиоза. Этими соображениями обусловлен выбор клеточной системы, культуры клеток человеческих макрофагов (ТНР-1). *Encephalitozoon cuniculi* и *Vittaforma corneae* представляют две независимых ветви М клады IV (Terresporidia). Эти два вида различаются морфологически, имеют разные типы развития и тканевую специфичность. *E. cuniculi* – специализированный паразит МФ позвоночных животных, развивается в паразитофорной вакуоли и вызывает гранулематозное воспаление различных органов. *V. corneae* развивается в прямом контакте с цитоплазмой клетки хозяина в эпителии сетчатки глаза. Была протестирована рабочая гипотеза, которую можно сформулировать следующим образом: заражение М ингибирует индуцированный апоптоз с помощью регуляции биохимических путей, ответственных за про- и анти-апоптозные механизмы. Механизмы этой регуляции варьируют у двух филогенетически и биологически различных видов. Задачи заключались в следующем: (1) выяснить, как заражение *E. cuniculi* и *V. corneae* влияют на уровень апоптоза, индуцированного стауроспорином, в культуре ТНР-1 клеток; (2) показать ингибирование апоптоза в индивидуальных клетках; (3) сравнить эффект внесения живых и мертвых спор *E. cuniculi* и *V. corneae* на экспрессию генов, связанных с апоптозом.

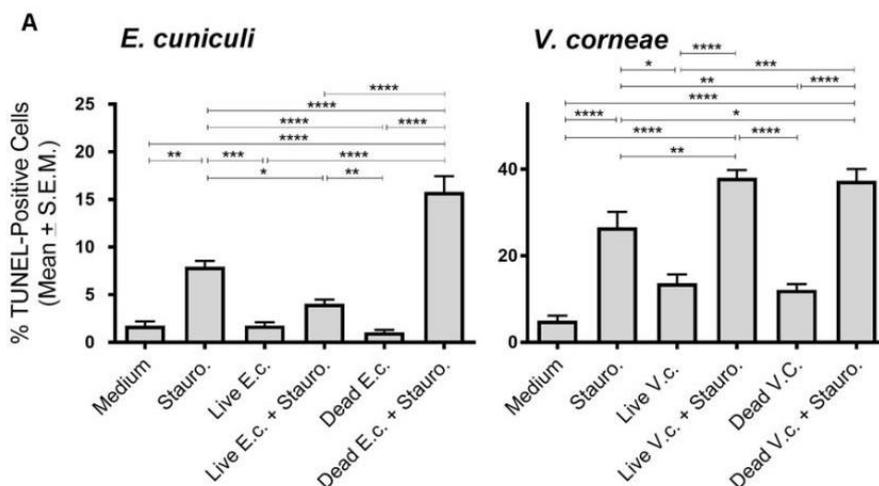
Заражение микроспоридиями подавляло активность каспазы 3 (К-3) и уменьшало количество апоптозных ядер, окрашенных по методу TUNEL в макрофагах, индуцированных стауроспорином (индуктор апоптоза). Заражение клеток ТНР-1 живыми спорами *E. cuniculi* и *V. corneae* приводило к снижению активности К-3, измеренной через 4 дня после внесения спор (Рис. 8). Внесение мертвых спор, напротив, приводило к повышению активности фермента. Инфекция *E. cuniculi*, но не *V. corneae* уменьшала долю TUNEL-положительных (апоптозных) ядер в популяциях клеток ТНР-1, наблюдаемых в СМ в светлом поле. Внесение живых спор *E. cuniculi* приводило к уменьшению количества TUNEL-положительных клеток на 30-60%. Внесение мертвых спор, напротив, существенно увеличивало долю апоптозных

ядер. Внесение спор *V. corneae* существенно не влияло на количество TUNEL-положительных макрофагов (Рис. 9). Для получения ответа на вопрос, затрагивает ли блокировка апоптоза только зараженные клетки, или она распространяется и на соседние незараженные клетки, был применен флуориметрический вариант метода TUNEL. Окраску TUNEL комбинировали с иммуноокрашиванием антителами против поверхностных антигенов М и с окраской ядер клеток флуоресцентным красителем TO-PRO-3. Анализ конфокальных изображений демонстрирует, что в случае заражения культуры клеток живыми спорами *E. cuniculi* лишь незначительная доля ядер окрашивались TUNEL: из 66 клеток с паразитофорными вакуолями *E. cuniculi* только две (3.3%) содержали апоптозные (TUNEL-положительные) ядра. Заражение спорами *V. corneae*, во-первых, в меньшей степени ингибировало индуцированный апоптоз (9.7% апоптозных клеток против 3.3% в случае *E. cuniculi*) и, во-вторых, почти в 22% клетках, содержащих споры и стадии *V. corneae*, наблюдался апоптоз, что не позволяет говорить об ингибировании апоптоза *V. corneae*. Инкубация с мертвыми спорами обоих видов увеличивала количество апоптозных клеток. Большинство мертвых спор к 4-му дню после заражения были переварены лизосомной системой МФ. В МФ с остатками мертвых спор регулярно наблюдались TUNEL-положительные ядра.

Анализ экспрессии генов, связанных с апоптозом. Чтобы понять механизм подавления апоптоза М, продемонстрированный с помощью измерения каспазной активности и окраски апоптозных ядер методом TUNEL, а также сравнить активность генов, связанных с апоптозом, при заражении разными М, мы выделили РНК из ТНР-1 клеток, инкубированных с живыми и мертвыми спорами *E. cuniculi* и *V. corneae* и сравнили уровни экспрессии 84 генов с помощью количественного ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией, используя набор «Qiagen Sabiosciences Apoptosis RT2» для экспрессии генов (мРНК), связанных с апоптозом в ТНР-1 клетках, инкубированных с живыми или мертвыми М в течение 4-х дней. Профили экспрессии в каждом случае сравнивали с контрольными МФ. В целом, МФ, зараженные живыми спорами, демонстрировали профиль экспрессии, соответствующий ингибированию апоптоза, а инкубированные с мертвыми спорами – наоборот, стимуляции (Рис. 10). Инкубация с мертвыми спорами *E. cuniculi* привела к увеличению доли



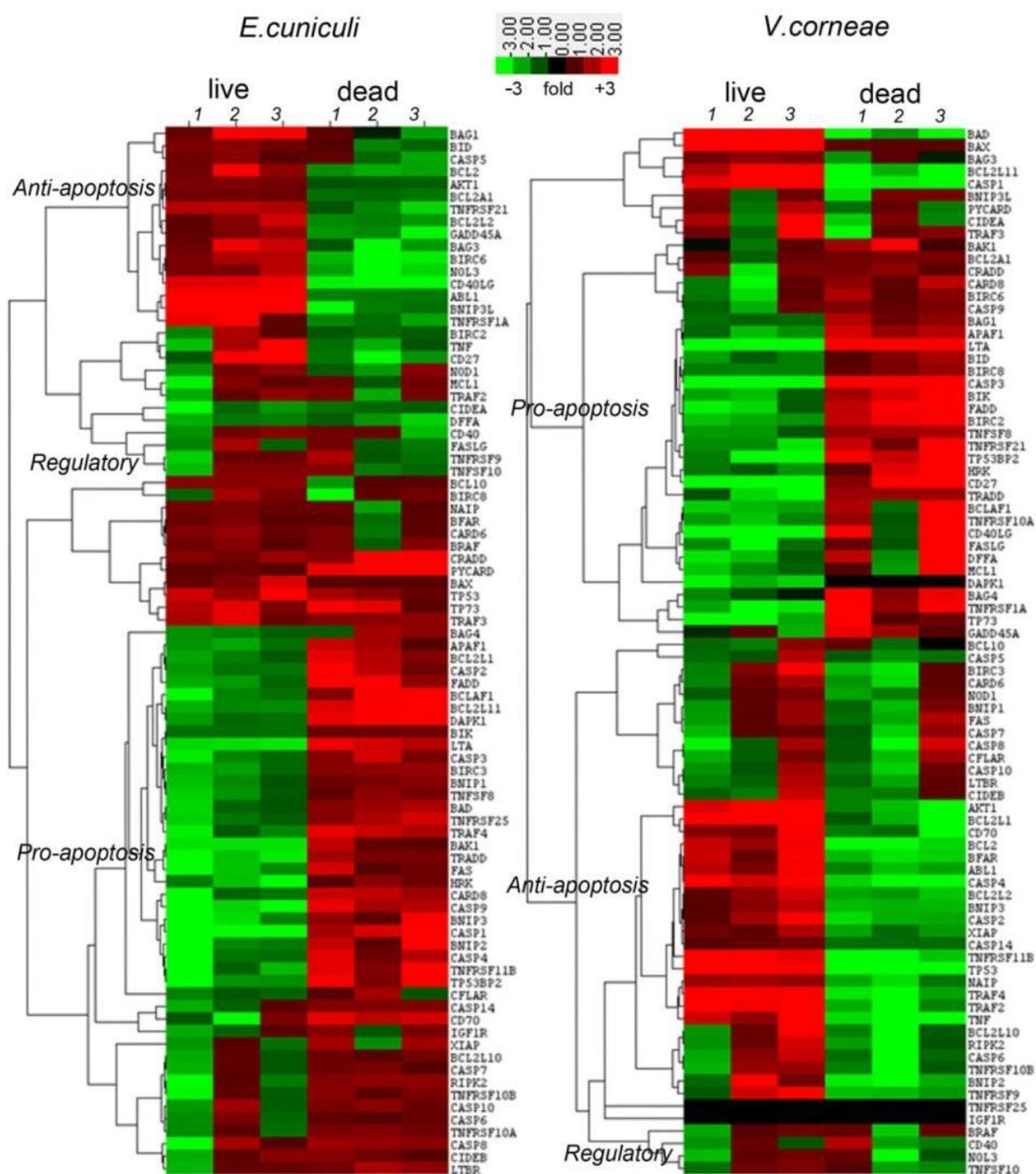
**Рисунок 8.** Активность каспазы-3 в клетках ТНР-1 после культивирования с живыми и мёртвыми спорами *Encephalitozoon cuniculi* (Ec) и *Vittaforma corneae* (Vc). Через 4 дня после добавления спор клетки были индуцированы стауроспорином (Stauro). Активность фермента измерялась спектрофотометром через 4 часа после индукции апоптоза. Колонки: среднее  $\pm$  стандартная ошибка 3-х экспериментов в 3-х повторностях. Дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением методом Туки (Tukey's post hoc test for pairwise comparisons): \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .



**Рисунок 9.** Статистическая обработка результатов экспериментов с окрашиванием TNP-1 макрофагов колориметрическим методом TUNEL через 4 дня после внесения живых или мёртвых спор. Апоптоз индуцировали стауроспорином за 4 часа до фиксации. **А.** TUNEL-положительные клетки подсчитывали под микроскопом в светлом поле при увеличении 400X. Колонки представляют средние значения по 5 полям зрения с каждого из 10 стекол для одной экспериментальной группы  $\pm$  SEM. Дисперсионный анализ с последующим попарным сравнением методом Туки: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

апрегулированных про-апоптозных генов (93.5%) и уменьшению доли апрегулированных анти-апоптозных генов (36.1%). Напротив, заражение живыми спорами *E. cuniculi* сопровождалось снижением доли апрегулированных про-апоптозных генов (27.5%) и увеличением доли анти-апоптозных генов с повышенным уровнем регуляции (69.4%). В случае *V. corneae*, процент про- и анти-апоптозных генов, апрегулируемых при внесении мертвых и живых спор, существенно не различался и составил около 50% для каждой группы генов. Список генов, уровень экспрессии которых существенно изменялся при внесении спор микроспоридий, включал 42 гена, 23 из которых считаются про-апоптозными, 9 – антиапоптозными и 10 – регуляторными. Внесение спор микроспоридий значительно влияло на три группы генов, кодирующие (i) белки семейства BCL2 (11 генов), (ii) каспазы и их регуляторы (8 генов) и (iii) белки суперсемейств TNF и TNFR (11 генов). Наиболее заметным было 100-кратное повышение уровня экспрессии гена белка PT53 живыми спорами *V. corneae* (при 46-кратном снижении экспрессии мертвыми спорами). Подавление активности КЗ живыми (но не мертвыми) спорами *E. cuniculi* и *V. corneae* свидетельствует о блокировке заключительного этапа апоптозного каскада развивающимися в клетке паразитами, что соответствует предшествующим данным, полученным для М (DelAguila et al., 2006; Highes et al., 2013) и других протистов, например, для *T. gondii* (Payne et al., 2003). Окрашивание методом TUNEL позволяет визуализировать разрывы молекул ДНК, характерные для разрушающихся ядер также на заключительных стадиях апоптоза. Интересно, что в случае *V. corneae* не удалось продемонстрировать значительного уменьшения числа TUNEL+ клеток. Кроме того, флуоресцентный TUNEL в сочетании с иммуноокрашиванием спор показал, что >20% макрофагов со спорами *V. corneae* демонстрировали TUNEL+ ядра. Анализ экспрессии апоптозных генов, обусловленной внесением спор М, также выявил глубокие различия между двумя видами. Двенадцать из 42 генов, на которых заражение М повлияло наиболее значительно, разнонаправленно регулировались *E. cuniculi* и *V. corneae*. Выдвинуто предположение, что различия в блокировке апоптоза определяются биологическими особенностями видов. Вид *E. cuniculi* развивается в ПВ и может инфицировать соседние

клетки путем выстреливания спор, расположенных внутри ПВ. Кроме того, в случае естественного заражения МФ, нагруженные стадиями и спорами, заключенными в мембрану ПВ, служат для транспортировки паразита от первичного очага инфекции к другим тканям и органам организма. Таким образом, эволюция биохимических механизмов, обеспечивающих защиту клетки хозяина от преждевременной запрограммированной гибели, способствует биологическому успеху *E. cuniculi*. Однако *V. corneae*, в отличие от *E. cuniculi*, развивается в непосредственном контакте с цитоплазмой клетки-хозяина, и споры в конечном итоге заполняют всю цитоплазму. Споры *V. corneae* должны покинуть клетку-хозяина, чтобы запустить выброс полярной трубки для инфицирования соседних клеток. Смерть и разрушение клетки-хозяина после созревания спор – единственный способ доставить споры во внешнюю среду, т.е. защита от апоптоза после созревания спор не имеет смысла. Другой отличительный признак *V. corneae* – образование би- и многоядерных клеток, которое наблюдалось и ранее при заражении другого типа клеток этим паразитом (Leitch et al., 2005). Исходя из наших данных, можно заключить, что инфекция *V. corneae* в меньшей степени подавляет апоптоз, зато специфически влияет на клеточный цикл зараженных клеток, вызывая нарушения цитокинеза. Экспрессия ряда генов изменялась одинаково после внесения живых спор обоих видов: антиапоптотный ген Bcl-2 апрегулировался, тогда как проапоптотные гены LTA, CARD8 TP53BP2, DARC1 и BCLAA1 были даунрегулированы. Учитывая, что мертвые споры *E. cuniculi* и *V. corneae* модулировали экспрессию этих генов в обратном направлении, предполагается, что оба вида М в ходе внутриклеточного развития продуцируют антиапоптотные стимулы. В случае *V. corneae*, заметная (+10,7) положительная регуляция Bad, члена группы белков BH3, регуляторов митохондриального сигнального пути, вместе с повышенной экспрессией протеинкиназы Akt1 (+4.38), может указывать на то, что микроспоридиоз вызывает фосфорилирование Bad, как это описано для *Trypanosoma cruzi* и *Leishmania* spp. (Aoki et al., 2006; Ruhland et al., 2007). Существенное влияние заражения микроспоридиями на экспрессию белков семейства Bcl-2 было ожидаемым. Это семейство включает про- и анти-апоптотные модуляторы апоптотного пути, которые регулируют высвобождение цитохрома С и других про-апоптотных факторов из межмембранного пространства митохондрий (Luo et al., 1998). Белки Bcl-2 регулируются многими внутриклеточными паразитами в обоих направлениях (Faherty, Maurelli, 2008; Graumann et al., 2009). В клетках кишечного эпителия пчел, инфицированных микроспоридиями *N. ceranae* и *N. bombycis*, зарегистрирована апрегуляция белка, гомологичного анти-апоптотному Bcl-2 (“*Drosophila* buffy protein”) (Martin-Hernandes et al., 2017). Каспаза K9, экспрессия которой заметно снижалась (-5.53) после заражения *E. cuniculi*, запускает расщепление про-каспазы 3 и последующие реакции, приводящие к дезинтеграции и смерти клеток (Btatton, Salvesen, 2010). Подавление K3 и K9, наряду с активацией анти-апоптотного Bcl-2, показывает, что *E. cuniculi* и, вероятно, *V. corneae* контролируют митохондриальный сигнальный путь. Ранее было показано, что именно этот путь наиболее часто отрицательно регулируется многими внутриклеточными паразитами (Graumann et al., 2009). Помимо модулирования апоптоза белки семейства Bcl-2 могут функционировать в качестве регуляторов воспалительного ответа на инфекции различных про- и эукариотических паразитов. В наших опытах повышенная экспрессия про-апоптотных Bcl-2L1 и Bcl-2L11 после заражения *V. corneae* (но не *E. cuniculi*), может свидетельствовать о том, что *V. corneae* вызывает сильный воспалительный ответ, который подавляется в случае инфекции *E. cuniculi*. Вывод о том, что *V. corneae* и *E. cuniculi* активируют различные воспалительные пути, подтверждается данными о негативной регуляции каспазы K1 и K4 живыми спорами *E. cuniculi* (-4.78 и - 2.24 соответственно), и положительной регуляции – живыми спорами *V. corneae* (+8.17 и +3.32). Эти две функционально взаимосвязанные каспазы (K1 действует как субстрат для K4) играют роль в воспалении и врожденном неспецифическом иммунитете, участвуют в формировании инфламмосом и активируют секрецию цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-18 макрофагами млекопитающих (Sollberg et al., 2012). Вероятно, у *E. cuniculi* сформировались механизмы подавления «воспалительных» каспаз. С другой стороны, инфекция *E. cuniculi* характеризовалась



**Рисунок 10.** Дифференциальная экспрессия 84 генов в THP-1 макрофагах (МФ), инкубированных с живыми и мертвыми спорами *E. cuniculi* и *V. corneae*. Цифры курсивом сверху обозначают 3 повторности. Цвета указывают на уровень экспрессии относительно МФ, не обработанных спорами. Тепловые карты и иерархические деревья кластеров генов, связанных с апоптозом построены с помощью алгоритмов Cluster Software и Java Treeview (de Hoon et al., 2004; Eisen et al., 1998)).

избыточной экспрессией генов CD 27, CD 40LG, TNFRSF1A и TNFRSF21, которые, напротив, были отрицательно регулированы *V. corneae*. Все эти члены надсемейства TNFR (рецепторы фактора некроза опухоли) – провоспалительные модуляторы и/или мощные цитокины (Nehlgans, Pfeffer, 2005). Положительная регуляция этих генов *E. cuniculi*, вероятно, помогает паразиту рекрутировать иммуно-компетентные клетки – макрофаги, лейкоциты,

моноклеациты и эозинофилы, индуцировать клеточную пролиферацию и формировать множественные гранулемы, наиболее характерную черту патологии *Encephalitozoon* spp. в теплокровных хозяевах (Weiss, 2014). Наконец, стократное повышение экспрессии гена p53 после заражения *V. corneae* указывает на исключительную роль этого транскрипционного фактора во взаимодействии *V. corneae* с клеткой-хозяином.

Результаты анализа собственных и литературных данных о влиянии микроспоридий на апоптоз клетки хозяина можно кратко резюмировать следующими положениями. (1) Пути контроля сигнальных путей, ведущих к гибели клетки хозяина, различны для разных видов М. Варьирование способов модуляции клеточного цикла и апоптоза клеток хозяина разными видами М предполагает, что в ходе эволюции имела место тонкая настройка этих процессов в соответствии с физиологическими адаптациями паразита. (2) Подавление КЗ и К9, наряду с активацией анти-апоптозного Bcl-2, показывает, что М контролируют митохондриальный сигнальный путь апоптоза. (3) Различные виды микроспоридий по-разному модулируют воспалительный ответ клетки-хозяина. Например, можно предположить, что в процессе адаптивной эволюции к паразитизму у *E. cuniculi*, специализированного паразита макрофагов млекопитающих, сформировались механизмы подавления «воспалительных» каспаз К1 и К4. (4) Сигнальный путь p53 играет особую роль в паразито-хозяинных отношениях при заражении микроспоридиями и требует дальнейшего изучения.

Полученные результаты позволяют наметить наиболее перспективные направления для будущих исследований, такие как: (i) изучение влияния микроспоридий на сигнальные пути транскрипционных факторов p53 и NF- $\kappa$ B (антагониста p53), (ii) анализ роли белков теплового шока в защите от апоптоза при микроспориidioзе, (iii) изучение пост-трансляционных модификаций и транслокации белка p53 в ядро и митохондрии клетки хозяина, (iv) изучение кинетики экспрессии генов, а также (v) сравнение действия различных видов М на элементы апоптозного каскада клеток разных типов и разных хозяев.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертации обобщены исследования по клеточной биологии, таксономии, происхождению и эволюции микроспоридий, выполненные автором с 1995 по 2017 г. Изучена ультраструктура более 20 видов М, включая двух представителей базальной группы *Metchnikovellidae*. На основании молекулярного филогенетического и ультраструктурного анализов описано 12 новых для науки видов М и выделено 6 новых родов, а в целом уточнено или определено положение в системе 30 видов М, паразитирующих в грегарирах, ракообразных, насекомых и позвоночных. Среди этих видов большинство – паразиты хозяйственно важных организмов, таких как промысловые десятиногие раки, шмели-опылители, огненные муравьи, стадные и нестадные саранчовые, чешуекрылые – вредители леса. Изученные виды М принадлежат ко всем пяти известным филогенетическим группам (суперкладам) типа *Microsporidia*, что позволило оценить размах варибельности клеточной организации М, выявить различные направления приспособительной эволюции и морфологические корреляты диверсификации внутри отдельных групп М, а также разрешить некоторые проблемы таксономии М изученных групп. В частности, изучена ультраструктура и установлены филогенетические связи для (а) *Agmasoma penaei* и *Perezia nelsoni*, паразитов хозяйственно важных морских Decapoda; (б) *Alfvenia sibirica* и *Agglomerata cladocera* – микроспоридий, паразитирующих в наиболее массовых пресноводных ракообразных отрядах Cladocera и Cyclopoidea; (в) представителей рода *Paranosema* – паразитов жирового тела прямокрылых (сверчков и стадных саранчовых) и жуков; (г) видов рода *Liebermannia*, адаптированных к паразитированию в эпителиях кишечного тракта и его придатков саранчовых Нового Света; (д) типичного представителя рода *Nosema*, *N. disstriae*, паразитирующего в карантинном вредителе леса, *Malacasoma disstria* (Lepidoptera); (е) микроспоридии *Kneallhazia solenopsae* из огненных муравьев *Solenopsis invicta* (Hymenoptera), демонстрирующей сложный жизненный цикл, адаптированный к паразитированию в колонии социальных насекомых. На основании изучения таксономии и эволюции рода *Encephalitozoon*,

к которому принадлежат наиболее социально значимые виды М – паразиты сельскохозяйственных животных и человека, выделен и охарактеризован новый вид *E. rogonae*, специализированный паразит рептилий. Распространённость М у рептилий и изучение филогенетических связей этого вида с другими представителями рода показало древние корни паразитирования энцефалитозоонид у позвоночных животных.

Анализ литературных и собственных данных позволил сделать выводы о природе микроспорициальных инфекций человека. Несмотря на то, что подавляющее большинство М – паразиты беспозвоночных и рыб, и только 4 вида, принадлежащие к двум родам, из описанных примерно 200 родов и 1400 видов, можно считать паразитами человека, тем не менее, оппортунистические инфекции людей с пониженным иммунитетом несвойственными видами микроспорицидий достаточно широко распространены. Потенциальные источники таких инфекций – представители филогенетических клад М, включающие виды-«генералисты», такие как *Anncaliia-Tubulinozema*, *Trachipleistaphora-Vavraia*, *Endoreticulatus-Vittaforma*. Для выявления случаев возможной смены хозяев в процессе эволюции и оценки рисков заражения людей следует обращать особое внимание также на паразитов и гиперпаразитов, заражающих насекомых отрядов Psocoptera и Phtiraptera, паразитов блох, клещей, кровососущих двукрылых и чешуекрылых-гематофагов, ассоциированных с человеком и преадаптированных к развитию при высоких температурах.

Впервые с помощью специфического окрашивания мазков стула и ПЦР-диагностики выявлено заражение микроспорициями ВИЧ-инфицированных пациентов российского госпиталя. Пробы стула 19% обследованных пациентов содержали споры и ДНК микроспорицидий следующих видов: *Encephalitozoon intestinalis* (13%); *E. cuniculi* (2%); *E. hellem* (1%); *Enterocytozoon bieneusi* (1%); и два не описанных ранее генотипа. Эти данные, а также результаты клинических анализов свидетельствуют о важной роли микроспорицидоза в синдроме иммунодефицитов и подтверждают необходимость диагностики и лечения микроспорицидозов, которые в России не проводятся.

На основании изучения биоразнообразия и клеточной биологии различных групп М выделены две принципиальных причины успешности М как паразитов животных. Это, во-первых, усовершенствование способа заражения клетки с помощью аппарата экстрезии, в котором центральную роль играет полярная трубка – одновременно и продукт, и часть секреторного пути споры М. Во-вторых, с точки зрения паразито-хозяйинных отношений, успешность М связана со способностью модулировать клеточный цикл хозяина, в частности, противодействуя естественным процессам гибели клетки-хозяина. Проведённое автором изучение морфофункциональных особенностей секреторного компартмента М, подтвержденное результатами других исследователей, указывает на то, что на всех стадиях развития секреторный компартмент М организован в виде непрерывных тубулярных сетей, формирующихся de novo на последовательных стадиях жизненного цикла. MIN-компаратмент спороплазм, везикулярный кластер меронтов, тубулярный кластер споронтов, тубулярная сеть споробластов и даже сама полярная трубка зрелых спор представляют собой системы связанных между собой мембранных трубковидных структур. Транспорт секреторируемых белков, по-видимому, на всех стадиях происходит с помощью механизма прогрессивного созревания цистерн и слияния гомотипичных компартментов без участия везикулярного транспорта. Организация АГ микроспорицидий, особенно на ранних стадиях жизненного цикла, напоминает тубуло-везикулярные кластеры диких штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* (Rambourg et al., 2001, 2008), что согласуется с концепцией родства микроспорицидий и грибов. Можно предположить, что на базе тубулярного АГ в процессе адаптивной эволюции к внутриклеточному паразитизму у М сформировался комплекс органелл, который обеспечил возникновение уникального способа диссеминации. Трансформацию транс компартмента Гольджи в комплекс органелл аппарата экстрезии можно считать основным ароморфозом, связанным с возникновением типа Microsporidia, обеспечившим распространение и успех М как внутриклеточных паразитов животных. Специализация этого комплекса органелл к нуждам паразитирования в конкретных хозяевах

в значительной степени определила морфологическую диверсификацию внутри типа. Уникальной особенностью организации секреторного транспорта М является отсутствие на всех стадиях жизненного цикла везикул размером 50-60 нм, которые в соответствии с основными теориями секреторного транспорта обеспечивают антероградный и ретроградный транспорт карго и резидентных белков АГ. Микроспоридии представляют собой уникальную модель минимальной секреторной системы эукариотической клетки, функционирующей без эндосомальной части секреторного пути, без везикулярного транспорта, без механизма O-гликозилирования, перспективную для изучения общих вопросов физиологии и функциональной геномики внутриклеточного транспорта эукариот. С помощью ультраструктурного анализа и цитохимических методов также продемонстрирована структурная гомология органелл, представляющих собой модификации аппарата Гольджи: инвазионной трубки *Paramicrosporidium*, манубриума мечниковеллид и совершенного экструзивного аппарата высших М.

На специально разработанных экспериментальных моделях «микроспоридии человека *Encephalitozoon cuniculi* и *Vittaforma corneae* – культуры макрофагов человека» с помощью цитохимических методов, измерения активности каспазы 3 и анализа экспрессии генов, регулирующих клеточный цикл и апоптоз, впервые продемонстрировано существенное снижение способности заражённых макрофагов к апоптозу по сравнению с незараженными, апрегуляция анти-апоптозных генов (BLC2, TP53 и др.) и даунрегуляция про-апоптозных генов (FADD, CASP3, CD40LG, LTA и генов семейства TNF). Эти результаты позволили подтвердить гипотезу об ингибировании апоптозного каскада клетки хозяина при микроспориidioзе, а также высказать предположение о подавлении апоптоза как универсальном механизме патогенеза М.

Данная работа подтверждает важность включения паразитических протистов в число объектов клеточной биологии. Изучение цитологии, молекулярной биологии и разнообразия организации одноклеточных организмов, подобных микроспоридиям, позволяет лучше понять принципы функционирования и потенции эукариотической клетки, изучить возможности трансформации ее органелл для выполнения конкретных функций, а также связать морфофункциональную изменчивость с молекулярными (геномными) характеристиками.

В итоге работы (а) изучена ультраструктура 24 видов микроспоридий, что позволило реконструировать их жизненные циклы и в комбинации с данными по молекулярной филогении и хозяйинной специфичности продемонстрировать родственные связи и направления диверсификации внутри типа *Microsporidia*; (б) описана тонкая организация уникального аппарата Гольджи микроспоридий и показана его роль в формировании полярной трубки; (в) экспериментально продемонстрирован принципиальный механизм взаимодействия микроспоридий с клеткой хозяина, лежащий в основе патогенеза микроспориidioзов: подавление апоптоза. Анализ полученных данных позволяет сделать следующие выводы.

## ВЫВОДЫ

1. На основании выполненного молекулярно-филогенетического и ультраструктурного анализов описано 12 новых для науки видов микроспоридий, выделено 6 новых родов, уточнено положение в системе 20 видов микроспоридий, паразитирующих в членистоногих (ракообразных и насекомых).

2. Микроспоридии с примитивными признаками могут сохраняться у хозяев, представленных наиболее древними видами в пределах систематической группы. Так, жизненный цикл и строение клетки *Agmasoma penaei* демонстрируют серию плезиоморфных признаков, что хорошо согласуется с древностью их хозяев, представителей сем. Penaeidae, базальной группы Decapoda.

3. Для паразитов всеветно распространенных морских Decapoda из сем. Penaeidae, таких как *A. penaei* и *P. nelsoni*, характерно формирование клинов постепенно изменяющихся видов со слабо выраженными морфологическими и генетическими различиями.

4. Анализ ультраструктуры, хозяйинной специфичности и молекулярной филогении *Apotadorsa heleioides* указывает на существование клады близкородственных микроспоридий, объединяющей морфологически различные формы, паразитирующие в окуневых рыбах и креветках сем. Carideae, и на наличие сложных циклов с циркулированием паразита между этими группами хозяев.

5. Изучение паразито-хозяйинных отношений микроспоридий показало их высокие адаптивные возможности в приспособлении к жизни в клетках хозяев разного типа или в разных формах хозяев. Так, три изученные вида нового рода *Liebermannia* демонстрируют видоспецифичные клеточные адаптации к паразитированию в различных эпителиях кишечного тракта (Мальпигиевых сосудах, слюнных железах и средней кишке); в частности, обитание в быстро обновляющихся энтероцитах ведет к укорачиванию жизненного цикла, упрощению строения спор и выходу спороплазм из молодых спор с неразвитой полярной трубкой. *Kneallhazia solenopsae* из огненных муравьев *Solenopsis invicta* (Hymenoptera) демонстрирует сложный полиморфный жизненный цикл с формированием 4-х видов спор, адаптированный к паразитированию в колонии социальных насекомых, представленной как минимум 7 жизненными формами (яйца, личинки, куколки, 2 касты рабочих, королевы, самцы).

6. Изучение *Nosema disstriae* – типичного представителя рода *Nosema* из клады *N. bombycis*, состоящей из близкородственных паразитов чешуекрылых с инвертированной структурой комплекса генов РНК, указывает на необходимость использования дополнительного генетического маркера – гена RPB1 для установления филогенетических связей между видами этой группы. Так мультигенный филогенетический с включением гена RPB1 и наличие октоспоровой спорогонии в ветви *N. disstriae-V. antheraeae* показали, что выпадение сексуальной фазы происходило неоднократно (как минимум дважды) в процессе диверсификации NbК.

7. *Encephalitozoon* – единственный род микроспоридий, диверсифицированный среди высших позвоночных, что указывает на древность паразитизма энцефалитозоонид у позвоночных хозяев. Это подтверждается анализом распространенности микроспоридий рода *Encephalitozoon* у рептилий, возможностью описания нового вида *E. pogonae* и изучением филогенетических связей этого вида.

8. Впервые в России исследовано распространение и видовое разнообразие микроспоридий, встречающихся у людей с ВИЧ-инфекцией; разработаны и предложены клинические методы тестирования на микроспоридиоз, показанные для ВИЧ-инфицированных больных с симптомами «диарей неясной этиологии» и с пониженным титром т-лимфоцитов (число CD4 клеток <100).

9. Сравнительный анализ ультраструктуры двух видов мечниковеллид, *Paramicrosporidium* (Rozellomycota) и «высших» микроспоридий продемонстрировал структурную гомологию инвазионной трубки парамикроспоридий, манубриума мечниковеллид и совершенного аппарата экстрезии «высших» микроспоридий.

10. Микроспоридии представляют собой модель минимальной секреторной системы эукариотической клетки, перспективной для изучения общих вопросов физиологии и функциональной геномики внутриклеточного транспорта эукариот. Изучение секреторного транспорта во внутриклеточных стадиях и функциональной морфологии аппарата Гольджи на разных этапах жизненного цикла микроспоридий выявило следующие особенности.

- На всех этапах жизненного цикла АГ организован в виде тубулярных сетей (ТС). Полярная трубка, формирующаяся на стадии споробласта, представляет собой гипертрофированную транс цистерну АГ.

- Секреторный транспорт осуществляется при полном отсутствии везикул с помощью мутационного механизма в соответствии с гипотезой «быстрой компарментализации цистерн».

- Микроспоридии демонстрируют минимизацию секреторного пути, выраженную в элиминации эндосомального пути, O-гликозилирования и везикулярного транспорта.

11. На экспериментальных клеточных моделях продемонстрировано существенное снижение способности макрофагов к индуцированному апоптозу при заражении микроспоридиями *Encephalitozoon cuniculi* и *Vittaforma corneae*.

- Заражение микроспоридиями ведет к положительной регуляции анти-апоптозных генов (BCL2, TP53 и др.) и отрицательной регуляции про-апоптозных генов (FADD, CASP3, CD40LG, LTA и генов семейства TNF).

- Подавление активности и экспрессии каспаз 3 и 9, наряду с активацией анти-апоптозного гена Bcl-2 обоими изученными видами микроспоридий, показывает, что эти паразиты контролируют митохондриальный сигнальный путь апоптоза.

- Различные виды микроспоридий по-разному модулируют воспалительный ответ клетки-хозяина, например, у *E. cuniculi*, специализированного паразита макрофагов млекопитающих (но не у *V. corneae*, паразита эпителия сетчатки глаза), сформировались механизмы подавления «воспалительных» каспаз K1 и K4.

## СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

*Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования,*

1. Видтман, С.С. Описание нового рода *Larssonia* на основании ультраструктурного анализа *Microsporidium (Pleistophora) obtusa* Moniez, 1887 из *Daphnia pulex* (Cladocera) / С.С. Видтман, Ю.Я. Соколова // Паразитология. – 1994. – Т. 28. С. 202-314.

2. Соколова, Ю.Я. Микроспоридия *Nosema grylli* n.s. из сверчков *Gryllus bimaculatus* / Ю.Я. Соколова, К.В. Селезнев, В.В. Долгих, И.В. Исси // Паразитология. – 1994. – Т. 28. – С. 488-493.

3. Видтман, С.С. Новая микроспорида *Alfvenia ceriodaphniae* из *Ceriodaphnia reticulata* (Crustacea, Cladocera) / С.С. Видтман, Ю.Я. Соколова // Паразитология. – 1995. – Т. 29. – С. 214-218.

4. Соколова, Ю.Я. О роде *Nosema* (Microsporidia) в связи с новыми данными по жизненному циклу *Nosema mesnili* Paillot (1933) (Microsporidia, Nosematida) / Ю.Я. Соколова, И.В. Исси // Паразитология. – 1997. – Т. 31. – С. 307-313.

5. Исси, И.В. Микроспоридиоз красногрудой пьявицы *Oulema melanopus* (Coleoptera) / И.В. Исси, Е.В. Моржина, С.В. Крылова, Ю.Я. Соколова // Паразитология. – 1998. – Т. 32. – С.275-279.

6. Соколова, Ю.Я., Насонова Е.С., Сомова Н.В., Скарлато С.О. 1998. Ультраструктура ядерного аппарата и электрофоретический кариотип микроспоридии *Nosema grylli* – внутриклеточного паразита сверчка *Gryllus bimaculatus*/ Ю.Я. Соколова, Е.С. Насонова, Н.В. Сомова, С.О. Скарлато // Цитология. – 1998. – Т. 40. – С.407-415.

7. Соколова, Ю.Я. Подавление эстеразной активности как особенность патогенеза микроспоридиоза сверчка *Gryllus bimaculatus*/ Ю.Я. Соколова, О.В. Сундуков // Паразитология. – 1999. – Т. 33. – С.527-535

8. Соколова, Ю.Я. Морфофункциональный анализ гемоцитов сверчка *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) в контроле и при остром микроспоридиозе, вызванном *Nosema grylli* / Ю. Соколова, Ю. Токарев, Я. Лозинская, В. Глупов // Паразитология. – 2000. – Т. 34. – 534-543

9. Исси, И.В. О паразитофорной вакуоли микроспоридий / И.В. Исси, Ю.Я. Соколова, В.Н. Воронин // Паразитология. – 2001. – Т. 35. – С. 45-59.

10. **Соколова, Ю.Я.** Необычная организация аппарата Гольджи на пролиферативных стадиях жизненного цикла микроспоридий / Ю.Я. Соколова, Е.С. Снигиревская, С.О. Скарлато, Я.Ю. Комиссарчик, А.А. Миронов // Доклады Академии Наук, Биология. – 2001. – Т. 378. – С. 403-406.
11. Крюкова, Н.А. Микроспориоз личинок стрекоз *Aeshna viridis* (Odonata: Aeshnidae) вызываемый *Systemostrema alba* Larsson, 1988 (Microsporida, Thelohaniidae) / Н.А. Крюкова, **Ю.Я. Соколова**, В.В. Глупов // Паразитология. – 2006. – Т. 40. – С. 66-73.
12. Снигиревская, Е.С. Структурно-функциональная организация аппарата Гольджи / Е.С. Снигиревская, **Ю.Я. Соколова**, Я.Ю. Комиссарчик // Цитология. – 2006. – Т. 48. – С. 57-81.
13. **Соколова, Ю.Я.** Аппарат Гольджи паразитических простейших (обзор литературы) / Ю.Я. Соколова, Е.С. Снигиревская, Я.Ю. Комиссарчик // Цитология. – 2007. – Т. 49. – С. 163-181
14. **Соколова, Ю.Я.** Происхождение микроспоридий и их положение в системе эукариот / Ю.Я. Соколова // Микология и Фитопатология. – 2009. – Т. 43. – С. 177-192.
15. Соколова, О.И. Опыт использования технологии ФТА® для сбора, архивирования и молекулярного анализа ДНК микроспоридий из клинических образцов / О.И. Соколова, А.В. Демьянов, Л.С. Боверс, Е.С. Дидье, **Ю.Я. Соколова** // Цитология. – 2011. – Т. 53. – С. 911-914.
16. **Sokolova, I.** Electron-microscopic and electrophoretic studies of microsporidian prespore stages isolated from infected host cells by gradient centrifugation on Percoll / I. Sokolova, K. Selesnjov, V. Dolgikh, I. Issi // J. Eukaryot. Microbiol. – 1994. – V. 41. – P. S62-S62.
17. **Sokolova, J., Entzeroth R.** Morphological and immunological studies on microsporidia: antigene properties of *Nosema mesnili* spores / J. Sokolova, R. Entzeroth // Archiv fur Protistenkunde. – 1995. – V. 145, № 1-2. – P. 100-104.
18. Seleznev, K.V. Fractionation of different life cycle stages of microsporidia *Nosema grylli* from crickets *Gryllus bimaculatus* by centrifugation in percoll density gradienr for biochemical research / K.V. Seleznev, I.V. Issi, V.V. Dolgikh, G.B. Belostotskaya, O.A. Antonova, **J.J. Sokolova** // J. Eukaryot. Microbiol. – 1995. – V. 42, № 3. – P. 288-292.
19. Dolgikh, V.V. Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the spores of the microsporidian *Nosema grylli* / V.V. Dolgikh, **J.J. Sokolova**, I.V. Issi// J. Eukaryot. Microbiol. – 1997. – V. 44, № 3. – P. 246-249.
20. **Sokolova, Y.Y.** Analysis of antibodies raised against soluble and membrane bound proteins of *Nosema grylli* (Microspora) spores / Y.Y. Sokolova, V.V. Dolgikh, A. Weck-Heimann., R. Entzeroth // Tsitologiya. – 2000. – V. 42, № 10. – P. 993-1003.
21. Nasonova, E.S. Phagocytosis of *Nosema grylli* (Microsporida, Nosematidae) spores in vivo and in vitro / E.S. Nasonova, Y.S. Tokarev, T. Trammer, R. Entzeroth, **Y.Y. Sokolova** // J. Eukaryot. Microbiol. – 2001. Supplement. – P. 83S-84S.
22. **Sokolova, Y.** Development of *Thelohania solenopsae* in red imported fire ants *Solenopsis invicta* from polygynous colonies results in formation of three spore types / Y. Sokolova, J. Fuxa, // J. Eukaryot. Microbiol. – 2001. Supplement. – P. 85S.
23. **Sokolova, Y.** Visualization of early Golgi compartments at proliferate and sporogenic stages of a microsporidian *Nosema grylli* / Y. Sokolova, E. Snigirevskaya, E. Morzhina, S. Skarlato, A. Mironov, Y. Komissarchik // J. Eukaryot. Microbiol. – 2001. – Supplement. – P. 86S-87S.
24. **Sokolova, Y.** An ultrastructural study of *Nosema locustae* Canning (Microsporidia) from three species of Acrididae (Orthoptera). / Y. Sokolova, C. Lange // Acta Protozoologica. – 2002. – V. 41. – P. 229-237.
25. **Sokolova, Y.Y.** Establishment of the new genus *Paranosema* based on the ultrastructure and molecular phylogeny of the type species *Paranosema grylli* gen. nov., comb. nov (Sokolova, Seleznirov, Dolgikh, Issi 1994), from the cricket *Gryllus bimaculatus* Deg / Y.Y. Sokolova, V.V. Dolgikh, E.V. Morzhina, E.S. Nasonova, I.V. Issi, et al. // J. Invertebr. Pathol. – 2003. – V. 84, № 3. – P. 159-172.
26. **Sokolova, Y.Y.** PCR-based analysis of spores isolated from smears by laser pressure catapult microdissection confirms genetic identity of spore morphotypes of the microsporidian *Thelohania*

*solenopsae* / Y.Y. Sokolova, L.R. McNally, J.R. Fuxa // J. Eukaryot. Microbiol. – 2003. – V. 50. – P. 584-585.

27. **Sokolova, Y.Y.** The microsporidium *Thelohania solenopsae* in red imported fire ants (Hymenoptera: Formicidae) from Louisiana pastures / Y.Y. Sokolova, R.L. Bossard, J.R. Fuxa, D.W. Sanson, L.D. Foil // Southwest. Entomol. – 2004. – V. 29. – P. 271-276.

28. **Sokolova, Y.Y.** Spore morphotypes of *Thelohania solenopsae* (microsporidia) described microscopically and confirmed by PCR of individual spores microdissected from smears by position ablative laser microbeam microscopy / Y.Y. Sokolova, L.R. McNally, J.R. Fuxa, S.B. Vinson // Microbiology. – 2004. – V. 150. – P. 1261-1270.

29. Milks, M.L. Comparative effectiveness of light-microscopic techniques and PCR in detecting *Thelohania solenopsae* (Microsporidia) infections in red imported fire ants (*Solenopsis invicta*) / M.L. Milks, **Y.Y. Sokolova**, I.A. Isakova, J.R. Fuxa, F. Mitchell, K.F. Snowden, S.B. Vinson // J. Eukaryot. Microbiol. – 2004. – V. 51. – P. 187-191.

30. Chen, J.S.C. Sources of spores for the possible horizontal transmission of *Thelohania solenopsae* (Microspora: Thelohaniidae) in the red imported fire ants, *Solenopsis invicta* / J.S. Chen, K. Snowden, F. Mitchell, **J. Sokolova**, J. Fuxa, S.B. Vinson // J. Invertebr. Pathol. – 2004. – V. 85. – P. 139-145.

31. **Sokolova, Y.Y.** Identification of Microsporidia infections in nature: Light microscopy or PCR? / Y.Y. Sokolova, I.M. Sokolov, J.R. Fuxa // Protistology. – 2004. – V. 3, № 4. – P. 273-281.

32. Fuxa, J.R. Interaction of an entomopathogen with an insect social form: an epizootic of *Thelohania solenopsae* (Microsporidia) in a population of the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* / J.R. Fuxa, M.L. Milks, **Y.Y. Sokolova**, A.R. Richter // J. Invertebr. Pathol. – 2005. – V. 88, № 1. – P. 79-82.

33. Fuxa, J.R. Prevalence, spread, and effects of the microsporidium *Thelohania solenopsae* released into populations with different social forms of the Red Imported Fire Ant (Hymenoptera: Formicidae) / J.R. Fuxa, **Y.Y. Sokolova**, M.L. Milks, A.R. Richter, D.F. Williams, D.H. Oi // Environ. Entomol. – 2005. – V. 34, № 5. – P. 1139-1149.

34. **Sokolova, Y.Y.** The nature of *Thelohania solenopsae* (Microsporidia) cysts in abdomens of red imported fire ants, *Solenopsis invicta* / Y.Y. Sokolova, J.R. Fuxa, O.N. Borkhsenius // J. Invertebr. Pathol. – 2005. – V. 90, № 1. – P. 24-31.

35. **Sokolova, Y.Y.** Ultrastructural analysis supports transferring *Nosema whitei* Weiser 1953 to the genus *Paranosema* and creation a new combination, *Paranosema whitei* / Y.Y. Sokolova, I.V. Issi, E.V. Morzhina, Y.S. Tokarev, C.R. Vossbrinck // J. Invertebr. Pathol. – 2005. – V. 90. – P. 122-126.

36. **Sokolova, Y.Y.** *Systemostrema alba* Larsson 1988 (Microsporidia, Thelohaniidae) in the dragonfly *Aeshna viridis* (Odonata, Aeshnidae) from South Siberia: morphology and molecular characterization / Y. Sokolova, N. Kryukova, V. Glupov, J. Fuxa // J. Eukaryot. Microbiol. – 2006. – V. 53, № 1. – P. 49-57.

37. **Sokolova, Y.Y.** Development, ultrastructure, natural occurrence, and molecular characterization of *Liebermannia patagonica* n. g., n. sp., a microsporidian parasite of the grasshopper *Tristira magellanica* (Orthoptera: Tristiridae) / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange, J.R. Fuxa // J. Invertebr. Pathol. – 2006. – V. 91, № 3. – P. 168-182.

38. Tokarev, Y.S. Melanization enhances teratospore formation in microsporidia-infected tissues of *Locusta migratoria* and *Gryllus bimaculatus* (Insecta, Orthoptera) / Y.S. Tokarev, **Y.Y. Sokolova**, R. Entzeroth // J. Invertebr. Pathol. – 2007. – V. 9. – P. 70-73.

39. Beznoussenko, G.V. Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and vesicular mechanisms of function / G.V. Beznoussenko, V.V. Dolgikh, E.V. Seliverstova, P.B. Semenov, Y.S. Tokarev, A. Trucco, M. Micaroni, D. Di Giandomenico, P. Auinger, I.V. Senderskiy, S.O. Skarlato, E.S. Snigirevskaya, Y.Y. Komissarchik, M. Pavelka, M.A. De Matteis, A. Luini, **Y.Y. Sokolova**, and A.A. Mironov // J. Cell Sci. – 2007. – V. 120. – P. 1288-1298.

40. **Sokolova, Y.Y.** Establishment of *Liebermannia dichroplusae* n. comb on the basis of molecular characterization of *Perezia dichroplusae* Lange, 1987 (Microsporidia) / Y.Y. Sokolova,

C.E. Lange, J.R. Fuxa // J. Eukaryot. Microbiol. – 2007. – V. 54, № 3. – P. 223-230.

41. **Sokolova, Y.Y.** Phylogenetic relationships of *Heterovesicula cowani*, a microsporidian pathogen of Mormon crickets, *Anabrus simplex* (Orthoptera : Tettigoniidae), based on SSU rDNA-sequence analyses / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange, J.R. Fuxa // J. Invertebr. Pathol. – 2008. – V. 99, № 1. – P. 112-116.

42. **Sokolova, Y.Y.** Biology and life-cycle of the microsporidium *Kneallhazia solenopsae* Knell Allan Hazard 1977 gen. n., comb. n., from the fire ant *Solenopsis invicta* / Y.Y. Sokolova, J.R. Fuxa // Parasitology. – 2008. – V. 135, № 8. – P. 903-929.

43. **Sokolova, Y.Y.** Morphology and taxonomy of the microsporidium *Liebermannia covasacrae* n. sp from the grasshopper *Covasacris pallidinota* (Orthoptera, Acrididae) / Y.Y. Sokolova, C.E. Lange, Y. Mariottini, J.R. Fuxa // J. Invertebr. Pathol. – 2009. – V. 101, № 1. – P. 34-42.

44. **Sokolova, Y.Y.** Identification of *Nosema bombi* Fantham and Porter 1914 (Microsporidia) in *Bombus impatiens* and *Bombus sandersoni* from Great Smoky Mountains National Park (USA) / Y.Y. Sokolova, I.M. Sokolov, C.E. Carlton // J. Invertebr. Pathol. – 2010. – V. 103, № 1. – P. 71-73.

45. **Sokolova, Y.Y.** New microsporidia parasitizing bark lice (Insecta: Psocoptera) / Y.Y. Sokolova, I.M. Sokolov, C.E. Carlton // J. Invertebr. Pathol. – 2010. – V. 104, № 3. – P. 186-194.

46. Sokolova, O.I. Emerging microsporidian infections in Russian HIV-infected patients / O.I. Sokolova, A.V. Demyanov, B.L. Cowers, E.S. Didier, A.V. Yakovlev, S.O. Skarlato, **Y.Y. Sokolova** // J. Clin. Microbiol. – 2011. – V. 49, № 6. – P. 2102-2108.

47. **Sokolova, Y.Y.** Fine structure of *Metchnikovella incurvata* Caullery and Mesnil 1914 (microsporidia), a hyperparasite of gregarines *Polyrhabdina* sp from the polychaete *Pygospio elegans* / Y.Y. Sokolova, G.G. Paskerova, Y.M. Rotari, E.S. Nasonova, A.V. Smirnov // Parasitology. – 2013. – V. 140, № 7. – P. 855-867.

48. **Sokolova, Y.Y.** Description of *Metchnikovella spiralis* sp. n. (Microsporidia: Metchnikovellidae), with notes on the ultrastructure of metchnikovellids / Y.Y. Sokolova, G.G. Paskerova, Y.M. Rotari, E.S. Nasonova, A.V. Smirnov // Parasitology. – 2014. – V. 141, № 8. – P. 1108-1122.

49. **Sokolova, Y.Y.** Morphology and phylogeny of *Agmasoma penaei* (Microsporidia) from the type host, *Litopenaeus setiferus*, and the type locality, Louisiana, USA / Y. Sokolova, A. Pelin, J. Hawke, N. Corradi // Intern. J. Parasitol. – 2015. – V. 45, № 1. – P. 1-16.

50. Rotari, Y.M. Diversity of metchnikovellids (Metchnikovellidae, Rudimicrosporea), hyperparasites of bristle worms (Annelida, Polychaeta) from the White Sea // Y.M. Rotari, G.G. Paskerova, **Y.Y. Sokolova** / Protistology. – 2015. – V. 9. – P. 50-59.

51. **Sokolova, Y.Y.** Perspectives of microsporidia as human pathogens: clues from invertebrate research (minireview) / Y.Y. Sokolova // Protistology. – 2015. – V. 9, № 3/4. – P. 117-126.

52. **Sokolova, Y.Y.** Establishing a new species *Encephalitozoon pogonae* for the microsporidian parasite of Inland bearded dragon *Pogona vitticeps* Ahl 1927 (Reptilia, Squamata, Agamidae) / Y.Y. Sokolova, K. Sakaguchi, D.B. Paulsen // J. Eukaryot. Microbiol. – 2016. – V. 63, № 4. – P. 524-535.

53. Stentiford, G. Microsporidia – emergent pathogens in the global food chain / G. Stentiford, J. Becnel, L. Weiss, P. Keeling, E. Didier S. B. Williams, S. Bjornson, M. Kent, M. Freeman, M. Brown, E. Troemel, K. Roesel, **Y. Sokolova**, K. Snowden, L. Solter // Trends Parasitol. – 2016. – V. 32, № 4. – P. 336-348.

54. **Sokolova, Y.Y.** Microsporidia *Alfvenia sibirica* sp n. and *Agglomerata cladocera* (Pfeiffer) 1895, from Siberian microcrustaceans and phylogenetic relationships within the "Aquatic outgroup" lineage of fresh water microsporidia / Y.Y. Sokolova, I.V. Senderskiy, Y.S. Tokarev // J. Invertebr. Pathol. – 2016. – V. 136. – P. 81-91.

55. **Sokolova, Y.Y.** *Perezia nelsoni* (Microsporidia) in *Agmasoma penaei*-infected Atlantic white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Paenaidae, Decapoda) and phylogenetic analysis of *Perezia* spp. complex / Y.Y. Sokolova, J. Hawke // Protistology. – 2016. – V. 10, № 3. – P. 67-78.

56. Kyei-Poku, G. The microsporidium *Nosema disstriae* (Thomson 1959): Fine structure and phylogenetic position within the *N. bombycis* clade / G. Kyei-Poku, **Y.Y. Sokolova** // J. Invertebr. Pathol. – 2017. – V. 143. – P. 90-103.

57. Tokarev, Y.S. Molecular and morphological characterization of *Anncaliia azovica* sp n. (Microsporidia) infecting *Niphargogammarus intermedius* (Crustacea, Amphipoda) from the Azov Sea / Y.S. Tokarev, **Y.Y. Sokolova**, A.A. Vasilieva, I.V. Issi // J. Eukaryot. Microbiol. – 2018. – V. 65, № 3. – P. 296-307.

58. Temereva, E.N. A Microsporidian Infection in Phoronids (Phylum Phoronida): *Microsporidium phoronidi* n. sp from a *Phoronis embryolabi* / E.N. Temereva, **Y.Y. Sokolova** // J. Eukaryot. Microbiol. – 2018. – V. 65, № 3. – P. 427-431.

59. Lange, C.E. The development of the microsporidium *Paranosema (Nosema) locustae* for grasshopper control: John Henry's innovation with worldwide lasting impacts / C.E. Lange, **Y.Y. Sokolova** // Protistology. – 2017. – V. 11, № 3. – P. 170-174.

60. **Sokolova, Y.Y.** Annotated list of species of the Microsporidia described in the Former Soviet Union and Russia in 20th century (1967–2000) / Y.Y. Sokolova, I.V. Issi, V.N. Voronin // Protistology. – 2018. – V. 12, № 1. – P. 12-37.

61. **Sokolova, Y.Y.**, Overstreet R.M. A new microsporidium, *Apotasporea heleios* n. g., n. sp., from the Riverine grass shrimp *Palaemonetes paludosus* (Decapoda: Caridea: Palaemonidae) / Y.Y. Sokolova, R.M. Overstreet // J. Invertebr. Pathol. – 2018. – V. 157. – P. 125-135.

62. **Sokolova, Y.Y.** *Encephalitozoon cuniculi* and *Vittaforma corneae* (Phylum Microsporidia) inhibit staurosporine-induced apoptosis in human THP-1 macrophages in vitro / Y.Y. Sokolova, L.C. Bowers, X. Alvarez and E.S. Didier // Parasitology (Cambridge). – 2018. – doi: 10.1017/S0031182018001968. [Epub ahead of print]

#### **Публикации в других научных изданиях, входящих в перечень ВАК РФ:**

63. Исси, И.В. Факторы патогенности микроспоридий – внутриклеточных паразитов насекомых / И.В. Исси, В.В. Долгих, **Ю.Я. Соколова**, Ю.С. Токарев // Вестник Защиты Растений. – 2005. – №3. – С. 16-25

64. Соколова, О.И. Микроспоририоз у ВИЧ-инфицированных пациентов / О.И. Соколова, А.В. Демьянов, Л.С. Боверс, Е.С. Дидье, С.О. Скарлато, **Ю.Я. Соколова**, А.В. Яковлев // ВИЧ-Инфекция и Иммуносупрессии. – 2013. – №3. – С. 63-70.

#### **Главы в коллективных монографиях:**

65. **Соколова, Ю.Я.** Энтомопатогенные простейшие и особенности патогенеза протозойных заболеваний насекомых / Ю.Я. Соколова, И.В. Исси // Патогены насекомых: структура и функция. – Москва: Круглый год, 2001. – С. 76-188.

66. Weidner, E. Microsporidian biochemistry and physiology / E. Weidner, A.M. Findley, V.V. Dolgikh, **J. Sokolova** // The Microsporidia and Microsporidiosis / Washington B. C.: American Society for Microbiology. – 1999. – P. 172-196.

67. **Sokolova, Y.Y.** Structure and function of the Golgi organelle in parasitic protists / Y.Y. Sokolova, A.A. Mironov // in: The Golgi Apparatus. State of art 110 years after Camillo Golgi's discovery. – 2008. – Springer. – P. 647-675.

68. Williams, B.A.P. Microsporidian biochemistry and physiology / Williams B.A.P., Dolgikh V.V., **Sokolova Y.Y.** // Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition / Weiss L. M., Becnel J. J. – Oxford: Wiley Blackwell, 2014. – P. 245-260.