

На правах рукописи

ПаскEROва Гита Георгиевна

Адаптации к паразитизму в базальных группах споровиков (Sporozoa, Apicomplexa)

1.5.17. Паразитология (биологические науки)

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2024

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

Научный руководитель:

Гранович Андрей Игоревич,

доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Тихоненков Денис Викторович,

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, главный научный сотрудник

Токарев Юрий Сергеевич,

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений”, заместитель директора по научной работе

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита состоится _____ 2025 г. в « ____ » часов на заседании диссертационного совета 24.1.026.01 на базе Зоологического института Российской академии наук по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Зоологического института Российской академии наук: <https://www.zin.ru/boards/24.1.026.01/theses.html>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ахметова Лилия Агдасовна

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Диссертация основана на исследованиях представителей базальных групп споровиков (Sporozoa, Apicomplexa), паразитирующих в морских беспозвоночных и изученных крайне фрагментарно и неоднородно. Новые данные по таким представителям облегчают трактовку ранних этапов эволюции споровиков.

Степень разработанности темы исследования. В литературе существуют противоречивые взгляды на макросистему Sporozoa: на состав архигрегариин и эугрегариин, на филогенетическое положение бластогрегариин и на филогенетические связи низших кокцидий. Несмотря на возрастающее число описаний новых видов, работ по тонкому строению споровиков разных филогенетических ветвей до сих пор крайне мало. Не выработана единая классификация прикрепительных органелл споровиков, что приводит к хаотичному использованию терминов «мукрон» и «эпимерит» в описании и таксономии архи- и эугрегариин. Практически отсутствуют исследования по подвижности трофозоитов споровиков разных филогенетических ветвей при одновременном огромном пуле исследований по подвижности зоитов у буквально единичных модельных объектов. Филогенетические построения в пределах Sporozoa основаны, главным образом, на анализе последовательностей гена 18S рРНК, тогда как использование одного этого маркера не позволяет получить филогенетические модели с хорошим разрешением и, соответственно, строить обоснованные эволюционные гипотезы. Для филогенетического анализа этой группы необходимо использовать большее число генных маркеров и привлекать более широкую выборку споровиков, в том числе, из базальных линий.

Цель и задачи исследования. Цель исследования – выявить анцестральные черты организации и адаптации к паразитизму споровиков на основе морфологических, ультраструктурных, молекулярных данных и особенностей взаимодействия с хозяином представителей базальных групп.

Задачи для достижения цели были разделены по объектам, представляющим базальные линии споровиков:

1. Провести сравнительное исследование архигрегариин и бластогрегариин с привлечением оригинальных данных по организации и подвижности трофозоитов, уделив особое внимание зоне контакта паразитов с клеткой хозяина, для определения анцестральных признаков базальных споровиков.

Объекты оригинального исследования: архигрегарины *Selenidium pygospionis* Paskerova et al., 2018, *S. pherusae* Paskerova et al., 2018, *Ditrypanocystis* sp. и бластогрегарины *Siedleckia* cf. *nematoides* Caullery et Mesnil, 1898, *Chattonaria mesnili* Chatton et Dehorne, 1929, comb. nov. Simdyanov et al., 2018.

2. Провести комплексное исследование строения клетки, прикрепительной органеллы и подвижности трофозоитов несептированных эугрегариин для установления синапоморфий.

Объекты оригинального исследования: несептированные эугрегарины *Polyrhabdina pygospionis* Caullery and Mesnil, 1914, emend. Paskerova et al., 2021, *P. cf. spionis* (von Kölliker, 1845) Mingazzini, 1891.

3. Выполнить морфологическое и молекулярно-биологическое исследование кишечных и целомических паразитов морских беспозвоночных для разработки сценария происхождения целомического паразитизма у несептированных эугрегариин.

Объекты оригинального исследования: несептированные эугрегарины *Urospora ovalis* Dogiel, 1910, *U. travisiae* Dogiel, 1910, *U. chiridotae* Dogiel, 1910.

4. Сравнить особенности строения, развития и локализации базальных кокцидиоморф в кишечнике хозяина, используя собственный материал и данные литературы, для выявления их анцестральных признаков и адаптаций к паразитизму.

Объекты исследования: протококцидии *Eleutheroshcizon duboscqi* Brasil, 1906, emend. Paskerova et al., 2023, *E. planoratum* Paskerova et al., 2023 и агамококцидии *Rhytidocystis pertsovi* Miroljubova et al., 2020, *R. dobrovoslkiji* Miroljubova et al., 2020, *Rhytidocystis* sp. из *Scoloplos armiger*, *Rhytidocystis* sp. из *Travisia forbesii*.

5. Установить распространение и эволюционные изменения пластид у споровиков разных филогенетических линий с помощью транскриптомного анализа исследуемых объектов и привлеченных данных по другим представителям Apicomplexa.

Объекты оригинального исследования: бластогрегарина *S. cf. nematoides*, несептированная эугрегарины *P. pygospionis* и агамококцидии *Rhytidocystis pertsovi*, *Rhytidocystis* sp. из *T. forbesii*.

Научная новизна исследования. Впервые показана природа аксиального тяжа архигрегаринов как серия пищеварительных вакуолей. Выявлена внутриклеточная стадия развития у архигрегаринов и агамококцидий (Mirolubova et al., 2020; Paskerova et al., 2018). Впервые определены ультраструктурные особенности, филогенетическое положение и таксономия бластогрегаринов (Simdyanov et al., 2018). Обоснована роль субпелликулярных микротрубочек и микрофиламентов в осуществлении непрогрессивного движения клеток архигрегаринов и бластогрегаринов (Kováčiková et al., 2019; Valigurová et al., 2017). Получены новые данные, обосновывающие трактовку прикрепительных органелл эугрегаринов как эпимерита (Paskerova et al., 2021). Оригинальные и привлеченные данные позволили определить признаки патогенеза у грегаринов, зараженных мечниковеллами (Frolova et al., 2023; Paskerova et al., 2016; Rotari et al., 2015; Sokolova et al., 2013, 2014). Впервые показано асинхронное развитие ооцист в гаметоцистах эугрегаринов рода *Urospora* и поднят вопрос о возможности аутоинвазии хозяина (Valigurová et al., 2023). Обобщены данные по подвижности трофозоитов как адаптации споровиков к существованию в определенной нише в хозяине (Дякин и Паскерова, 2004; Diakin et al., 2016). Впервые проведен сравнительный анализ строения и происхождения эпипелликулярной паразитофорной ниши вокруг *Ditrypanocystis* sp., *Eleutheroschizon* и *Cryptosporidium* (Butaeva et al., 2006; Paskerova et al., 2023; Valigurová et al., 2015). Установлено наличие пластид у архигрегаринов, бластогрегаринов, агамококцидий и протококцидий и поднят вопрос о независимой и многократной утрате пластид у эугрегаринов (Janouškovc et al., 2019). Обобщение материала по проникновению споровиков в клетку хозяина было использовано для трактовки процессов проникновения афелид в клетку-жертву и возникновения вокруг них паразитофорной вакуоли (Karpov, Paskerova, 2020).

Теоретическая и практическая значимость исследования. Анализ тонкого строения на разных стадиях развития и уточнение филогенетической позиции выбранных объектов позволяют провести таксономическую ревизию архигрегаринов, эугрегаринов, протококцидий, агамококцидий, бластогрегаринов. Полученные результаты позволяют понять процесс морфофункциональной трансформации инвазионной стадии в эндогенную стадию как результат адаптирования споровиков к существованию в среде обитания, предоставляемой организмом хозяина. В результате представления о происхождении и эволюции паразитизма среди споровиков получают новое развитие. Открытие широкого распространения пластид у споровиков базальных линий позволяет предложить новые экспериментальные модели для разработки медикаментов против болезней, вызываемых споровиками. Полученные данные уже используются при реализации дисциплин учебных планов бакалавриата (СВ.5017, СВ.5163) и магистратуры (ВМ.5514) Санкт-Петербургского государственного университета и могут быть рекомендованы к использованию в дисциплинах зоологической, паразитологической и цитологической направленности в университетах.

Методология и методы исследования. Объектами исследований послужили паразиты различных литоральных и сублиторальных беспозвоночных, главным образом, Белого моря, а также Японского моря и французского побережья Ла-Манша. Основные методы, которые автор использовала сама или в соавторстве в исследованиях:

1) полное морфологическое и молекулярно-биологическое (получение последовательностей маркерных генов) описание паразитических протистов, приведение аргументации для обоснования новых или подтверждения валидности существующих таксонов (вид, род, семейство, класс), уточнение таксономических диагнозов;

2) световая (светлопольная, фазовый контраст, дифференциально-интерференционный контраст, флюоресцентная, конфокальная) и электронная (сканирующая, трансмиссионная)

микроскопия живых и специфически фиксированных паразитических протистов, изолированных из или локализованных в составе тканей хозяина, для выявления особенностей их строения и локализации в хозяине;

3) проведение наблюдений за подвижностью изолированных паразитических протистов, а также постановка экспериментов по изменению их подвижности при обработке ясплакинолидом (индуцирует полимеризацию актина, стабилизирует филаменты), цитохалазином Д (ингибирует полимеризацию актина, разрушает микрофиламенты), оризалином (блокирует полимеризацию микротрубочек, разрушает микротрубочки) или колхицином (ингибирует полимеризацию микротрубочек);

4) филогенетический анализ на основе полученных непрерывных, практически полных последовательностей генов, кодирующих молекулы 18S, 5.8S, 28S рибосомных РНК, и спейсеров ITS1, ITS2 с использованием Байесовского подхода и метода максимального правдоподобия для выявления родства и филогенетического положения исследуемых паразитических апикомплексов;

5) транскриптомный анализ малого числа фиксированных паразитов (single cell transcriptomics) для выявления транскриптов белков у споровиков разных филогенетических линий.

Автор диссертации внесла непосредственный вклад в: планирование исследований, сбор и идентификацию хозяев, вскрытие хозяев, изолирование паразитических протистов из тканей хозяев, фиксирование изолированных объектов для их дальнейшего изучения разными методами. Я лично провела весь комплекс исследований апикомплекса на светооптическом и электронно-микроскопическом уровнях (от фиксирования материала до получения изображений) и интерпретировала полученные данные. Автор участвовала в обработке данных молекулярно-филогенетических и транскриптомных анализов, в обсуждении и корректировке условий для построения филогенетических гипотез. Автор диссертации участвовала в интерпретации иммуно-цитологического материала, задокументированного при помощи конфокальной микроскопии. Во всех случаях я участвовала в подготовке полученных материалов к публикации. Представлена таблица с объемом оригинального материала диссертации.

Положения, выносимые на защиту.

1. В базальных группах споровиков доминирует открытый эпицеллюлярный паразитизм, что позволяет рассматривать его как анцестральную форму взаимоотношений между паразитами и их хозяевами.

2. Появление прикрепительной органеллы и сохранение клеточной подвижности на стадии трофозойта рассматриваются как адаптации споровиков базальных групп к открытому эпицеллюлярному паразитизму в кишечнике хозяина.

3. Закрытый эпицеллюлярный паразитизм возникал вторично и независимо в эволюции споровиков разных линий; в каждом случае этот тип паразитизма можно рассматривать как более специализированный по сравнению с открытым эпицеллюлярным паразитизмом.

4. Внутриклеточная стадия у споровиков базальных линий может присутствовать кратковременно на начальном этапе их эндогенного развития; такой тип паразито-хозяинных отношений является анцестральным для споровиков в целом.

5. Пластиды широко распространены у споровиков базальных групп и имеют общее происхождение; у эугрегаринов наблюдается неоднократное исчезновение пластид в связи с их более глубокой адаптацией к внеклеточному паразитизму.

Степень достоверности и апробация результатов. По теме диссертации я опубликовала 19 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в SCOPUS. Из них 14 статей – в журналах, индексируемых в Web of Science Core Collection.

Основные положения я представила на различных мероприятиях: на сессиях Учебно-научной базы «Беломорская» Санкт-Петербургского государственного университета (6), на 67-х Чтениях, посвященных памяти члена-корреспондента Академии наук СССР, профессора В.А.

Догеля (1), на Всероссийских конференциях (4 выступления), на семинаре стипендиатов программы ДААД «Михаил Ломоносов» (1), на международных конгрессах по протистологии и паразитологии (23), а также на семинарах кафедры зоологии беспозвоночных Санкт-Петербургского государственного университета (2) и на семинаре Лаборатории по изучению паразитических червей и протистов Зоологического института РАН (1).

Структура и объём работы. Работа состоит из введения, девяти глав основной части, заключения, выводов, списков публикаций и выступлений автора по теме диссертации, списка цитированной литературы, а также перечня таблиц и иллюстраций (всего 267 страниц). Основная часть изложена на 181 страницах и содержит 34 рисунка и 11 таблиц. Список цитированной литературы включает 363 наименований, из которых 27 на русском языке, и 336 – на иностранных.

Благодарности. Автор выражает благодарность родным, друзьям и коллегам, оказавшим поддержку и помощь в работе над диссертацией. Я благодарю научного руководителя Андрея Игоревича Грановича за критические замечания и ценные советы по работе. Особая признательность – моему учителю, Андрею Александровичу Добровольскому (28.05.1939 – 16.07.2019) за привитую любовь к протистам и неизменный интерес к моим исследованиям.

Основное содержание работы

Глава 1 Принятая в диссертации система споровиков

В этой главе обосновывается система, в которой подтип Apicomplexa включает в себя два подтипа: Chromodellida (свободноживущие хищные жгутиконосцы и фотосинтезирующие симбионты кораллов) и Sporozoa (паразитические апикомплексы) (Janoušková et al., 2019). Автор приводит макросистему подтипа Sporozoa.

Глава 2 Основные черты споровиков, их стратегии паразитирования и эволюционные тенденции с обозначением фундаментальных задач-вопросов, требующих разрешения

В этой главе автор дает общую характеристику споровиков. В каждом разделе я указываю на фундаментальные проблемы, требующие разрешения.

В целом, для споровиков характерны две стратегии паразитирования: 1) внутриклеточный паразитизм, при котором паразит после внедрения в хозяина утрачивает клеточную полярность и подвижность; 2) внеклеточный паразитизм, при котором паразит сохраняет полярность клетки, модифицирует аппарат прикрепления к клетке хозяина и механизм подвижности (Крылов, Добровольский, 1980; Valigurová et al., 2015). Единжды или независимо несколько раз возникли эти два способа паразитизма, а также встречаются ли иные способы взаимоотношений паразита и хозяина – вопросы, требующие ответа.

2.1 Проникновение зоита в клетку хозяина

В этом разделе обобщаются многочисленные данные о механизме проникновения споровиков в клетку хозяина. Зоит обладает апикальным и базальным комплексом органелл, которые участвуют в подвижности зоита, поиске и распознавании необходимой клетки хозяина (мишени), в прикреплении к клетке-мишени и, наконец, в проникновении в клетку-мишень с формированием вокруг себя паразитофорной вакуоли. Скольжение зоитов обеспечивается поверхностными адгезивными белками, связанными с актин-миозиновым моторным аппаратом (глидесомой) в пространстве между плазмалеммой и внутренним мембранным комплексом пелликулы паразита (Frénal et al., 2017; Shaw, 2003; Sibley, 2004; и др.). Как модифицируется строение зоита, меняется его подвижность, и в какие взаимоотношения он вступает с клеткой хозяина при развитии в трофозоит у представителей разных филогенетических линий – важная фундаментальная задача современных исследований.

2.2 От споровиков к афелидам

Изложенное в этой главе обобщение по проникновению споровиков в клетку хозяина было использовано в статье-мнении по биологии афелид, филогенетически близких к микроспоридиям и развивающихся, главным образом, в клетках водорослей и зооспоровых

грибов. Дана трактовка процессов проникновения афелид в клетку-жертву и возникновения вокруг них паразитофорной вакуоли (Karpov, Paskerova, 2020).

2.3 Прикрепительный аппарат трофozoитов

Обобщая данные литературы (Desportes, Schrével, 2013; Kováčiková et al., 2017; Paskerova et al., 2018, 2021; Schrével et al., 2016; Simdyanov et al., 2017, 2018; Valigurová, Koudela, 2005, 2008; Valigurová et al., 2007, 2008, 2009; Valigurová, 2012; и др.), можно заключить, что степень развития прикрепительного аппарата у трофozoитов споровиков зависит от способа их локализации в хозяине и от их эволюционной истории: внутритканевая или внутриклеточная локализация без развития прикрепительного аппарата (нет выраженной полярности клетки) или с редуцированным аппаратом (агамококцидии, кокцидии, некоторые несептированные эугрегарины, неогрегарины); прикрепление к клетке(ам) хозяина за счет мукрона, развивающегося на основе апикального конца зоита, часто сохраняющего органеллы апикального комплекса и принимающего непосредственное участие в мизоцитозе (архигрегарины); прикрепление к клетке(ам) хозяина за счет прикрепительной органеллы (эпимерит) разной степени сложности строения, которая возникает впереди апикального конца зоита, не обладает органеллами апикального комплекса и, возможно, участвует в трансмембранном транспорте веществ (несептированные и септированные эугрегарины); формирование прикрепительного аппарата за счет модификации переднего отдела трофozoита, например, протомерита (некоторые септированные грегарины). Исследование различных способов контакта споровиков с клеткой хозяина позволит лучше понять становление и эволюцию паразитизма в этой группе.

2.4 Пластиды базальных споровиков

У некоторых архигрегаринов и агамококцидий были обнаружены органеллы, окруженные 4-мя мембранами и обладающими электронно-плотными телами или ламеллярными структурами внутри (Leander, Ramey, 2006; Schrével et al., 2016), морфологически сходные с апикопластами таких внутриклеточных споровиков как *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Babesia*, *Theileria* (Lim, McFadden, 2010; Tomova et al., 2006, 2009), но достоверно отсутствующими у *Cryptosporidium parvum* и у эугрегарины *Gregarina niphandrodes* (Huang et al., 2004b; Toso, Omoto, 2007). Как широко встречаются пластиды, обладают ли они общим метаболизмом среди споровиков разных филогенетических линий – вопросы, требующие ответа для понимания происхождения паразитизма среди этих одноклеточных.

2.5 Подвижность трофozoита

Внеклеточный паразитизм характерен, в большинстве случаев, для грегаринов (*Gregarinomorpha*). На стадии трофozoита эти споровики демонстрируют большое разнообразие форм и типов подвижности клетки, которые часто коррелируют с определенной локализацией паразита в пределах хозяина (Дякин, Паскерова, 2004; Diakin et al., 2016).

Большинство эугрегаринов – кишечные паразиты беспозвоночных. Для них характерно направленное скольжение всей клеткой с сохранением ее формы. Скольжение эугрегаринов отличается от субстрат-зависимого скольжения, наблюдаемого у зоитов споровиков, т.к. непосредственный контакт трофozoита эугрегарины с твердым субстратом не является необходимым условием для скольжения (Diakin et al., 2016; Valigurová et al., 2013). Наиболее вероятно, скольжение трофozoитов эугрегаринов определяется строением их эпицита (продольные гребни с набором цитоскелетных структур в их вершине: апикальные арки и апикальные филаменты, вероятно, актиновой природы). Считается, что эпицитарные гребни ундулируют в горизонтальной (вдоль гребня) и вертикальной (в вершине гребня) плоскостях и создают силу, проталкивающую эугрегарины вперед. Множественная экскреция слизи необходима для снижения силы трения, возникающей при перемещении паразита в водной среде.

Различные модификации эпицита отмечены у трофozoитов эугрегаринов семейств *Monocystidae* и *Urosporidae*, которые паразитируют в целоме и связанных с ним органах

кольчатых червей и иглокожих. Этим эугрегаринам свойственна непрогрессивная метаболизирующая подвижность – периодическое изменение формы в результате сокращения и/или изгибания всей клетки или только ее участка(ов). Предполагается, что метаболизм трофozoитов эугрегаринов обеспечивается субпелликулярным цитоскелетом, природа которого (только микрофибриллы или в сочетании с микротрубочками) остается не до конца известной (Diakin et al., 2016). Таким эугрегаринам необходимо уделить пристальное внимание для установления происхождения паразитизма в целоме хозяина и корреляции между строением кортекса и тем или иным типом клеточной подвижности.

2.6 Фундаментальные задачи, требующие разрешения

Здесь я выделяю задачи, которые стоят перед любым исследователем для определения набора адаптаций спорозоитов разных групп к существованию в хозяине.

1. Определить разнообразие способов контакта паразита с клеткой или тканью хозяина у спорозоитов разных филогенетических ветвей.
2. Классифицировать прикрепительные органеллы спорозоитов на основе происхождения, строения и функции.
3. Установить корреляцию между строением кортекса и присущим типом клеточной подвижности у спорозоитов с различными вариантами локализации в хозяине.
4. Выявить встречаемость плазмид и разнообразие их метаболических путей у спорозоитов разных эволюционных линий.
5. Определить филогенетические отношения между базальными линиями спорозоитов.

Глава 3 Архигрегарины: стратегии паразитирования при монотипичной организации клетки

Глава открывается обсуждением особенностей организации архигрегаринов. Следующие плезиоморфные признаки им характерны: зоитообразный план строения трофозоитов (морфостазис), мерогония в жизненном цикле. Результаты моих исследований позволяют предложить разные стратегии паразитирования для архигрегаринов.

3.1 Строение трофозоида архигрегаринов на примере *Selenidium pygospionis* и *S. pherusaе*

Строение трофозоитов *S. pygospionis* и *S. pherusaе* укладывается в общее представление об этой стадии у архигрегаринов: крупные клетки, сохраняющие организацию зоита. Мукрон (передний конец) обладает набором органелл апикального комплекса, выполняет роль прикрепительной органеллы и участвует в мизоцитозе цитоплазмы клетки хозяина. Трехмембранная пелликула подстлана продольно ориентированными микротрубочками, организованными в один или несколько слоев, прерывающихся в районе микропор (Рисунок 1). Приведены таблицы диагностических признаков архигрегаринов из полихет семейств Spionidae и Flabelligeridae (Paskerova et al., 2018).

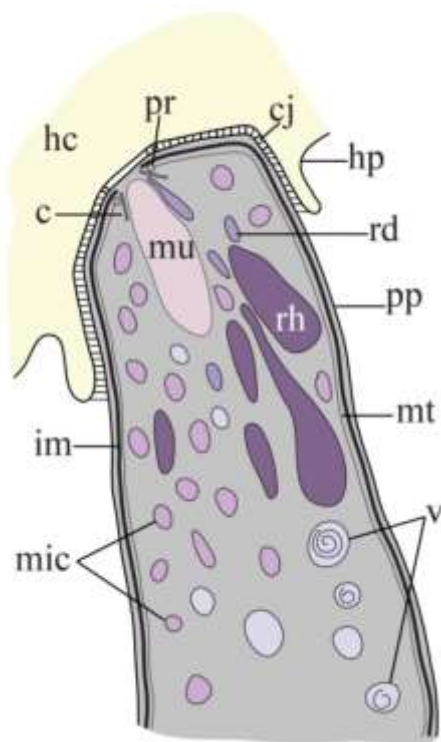


Рисунок 1 - Схема строения переднего конца архигрегарины, прикрепленной к кишечному эпителию хозяина, на примере *Selenidium pherusaе* (масштаб не соблюден)

Обозначения: c, коноид; cj, септатный контакт между клеткой хозяина и паразитом; hc, клетка хозяина; hp, плазмалемма клетки хозяина; im, внутренний мембранный комплекс пеликулы; mic, микронемы; mt, слой субпелликулярных микротрубочек; mu, мукрональная вакуоль; pp, плазмалемма паразита; pr, полярное кольцо; rh, роптрия; rd, участок протока роптрии; v, вакуоль.

3.2 Питание архигрегариин

В мукроне располагаются коноид, роптрии, микронемы. У архигрегариин дополнительно появляется мукрональная вакуоль, которая может быть связана посредством мембранных туннелей с серией вакуолей вдоль оси клетки («аксиальный тяж»). У *S. pygospionis* серия вакуолей является системой пищеварительных вакуолей, которые формируются в мукроне в процессе мизоцитоза и которые благодаря микрофиламентам в цитоплазме транспортируют питательные вещества от переднего конца к заднему. Питание может происходить и через микропоры (Paskerova et al., 2018).

3.3 Подвижность архигрегариин

Для исследуемых архигрегариин характерна изгибательная подвижность всей клеткой. Я провела эксперименты по изменению подвижности трофозоитов *S. pygospionis* в результате действия на них актин-модифицирующими веществами (ясплакинолид, цитохалазин Д) и реагентами, разрушающими или модифицирующими микротрубочки (оризалин и колхицин). Все вещества оказывали влияние на скорость и характер подвижности паразитов; отмечены изменения в расположении микрофиламентов и частичном или полном разрушении микротрубочек в субпелликулярном цитоскелете (полные результаты представлены в табличном виде). Я полагаю, что скольжение относительно друг друга субпелликулярных микротрубочек, связанных между собой и с пелликулой актиновыми связками, вызывает изгибательную подвижность трофозоитов. Аксиальный тяж играет роль гидроскелета для возвратного движения (Kováčiková et al., 2019). Подвижность трофозоитов архигрегариин отличается от субстрат-зависимого скольжения зоитов несмотря на сохранение общего плана строения.

3.4 Влияние гиперпаразитической микроспоридии *Metchnikovella dogieli* на архигрегариину *Selenidium pygospionis*

S. pygospionis заражается микроспоридией *M. dogieli* (Paskerova et al., 2016). По моим наблюдениям, зараженные селенидиумы серьезно деформированы и не способны совершать изгибы телом. Интенсивное развитие гиперпаразита в цитоплазме хозяина вызывает изменения или даже разрушения в субкортикальных структурах, а, возможно, и в аксиальном тяже, подобно тем изменениям, которые наблюдаются при обработке интактных клеток тубулин- или актин-модифицирующими веществами. Это косвенно подтверждает роль кортикального скелета (микротрубочки с микрофиламентами) и аксиального тяжа в подвижности архигрегариин. По сравнению с интактными у зараженных архигрегариин заметно снижаются количество и плотность расположения включений в цитоплазме. Метаболическая активность зараженного хозяина направлена не на накопление запасных веществ, а на развитие ее гиперпаразита (Frolova et al., 2023). Приведена таблица диагностических признаков микроспоридий рода *Metchnikovella*.

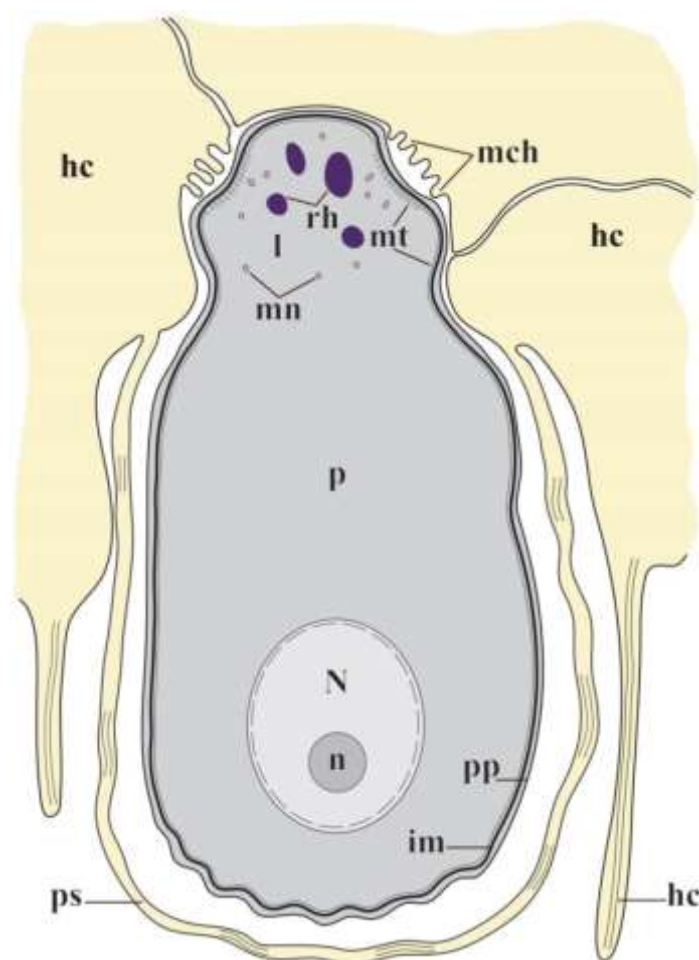
3.5 Внутриклеточное развитие архигрегариин на примере *Selenidium pygospionis*

Был обнаружен молодой трофозоит *S. pygospionis*, локализованный целиком в вакуоли внутри энтероцита хозяина (Paskerova et al., 2018). В литературе есть упоминания о внутриклеточной локализации молодых трофозоитов и у других архигрегариин (Ray, 1930). Установленное явление кратковременного внутриклеточного паразитирования у некоторых архигрегариин позволяет предположить происхождение внутриклеточных тканевых споровиков (Coccidiomorpha) от подобных архигрегариин.

3.6 Эпицеллюлярное развитие архигрегарины *Ditrypanocystis* sp. из олигохеты *Enchytraeus albidus*

Мукрон *Ditrypanocystis* sp. погружен между микроворсинками и ресничками кишечного эпителия хозяина и формирует лопасти, контактирующие с апикальной поверхностью сразу нескольких энтероцитов. В мукроне есть роптрии и микронемы, а также редкие митохондрии. Между паразитом и энтероцитами сохраняется узкое пространство, заполненное мембранными

каналами и везикулами. Источник формирования каналов и везикул в зоне контакта паразита и клетки хозяина – это, вероятно, микроворсинки и реснички энтероцитов, модифицированные



под влиянием секретов паразита. Реснички энтероцитов, располагающихся вне зоны контакта паразита и клеток хозяина, сливаются друг с другом с одновременной разборкой аксоном, образуя многослойную мембранную капсулу вокруг паразита (Рисунок 2; Butaeva et al., 2006). Таким образом, дитрипаноцистис развивается в закрытой, эпителиально расположенной нише.

Рисунок 2 - Схема организации паразитофорной ниши вокруг архигрегарины *Ditypanocystis* sp. (масштаб не соблюден)

Обозначения: hc, энтероцит хозяина, несущий реснички; im, внутренний мембранный комплекс пеликулы; l, лопасть переднего конца паразита; mch, мембранные каналы в зоне контакта паразита и клетки хозяина; mn, микронемы; mt, субпелликулярные микротрубочки; N, ядро; n, ядрышко; р, паразит; pp, плазмалемма паразита; ps, паразитофорный мешок, образованный путем модификации и слияния ресничек клетки хозяина; rh, роптрии.

3.7 Таксономия и филогения архигрегариин

Молекулярно-филогенетические работы (Lax et al., 2024; Rueckert, Horák, 2017; Rueckert, Leander, 2009a; Schrével et al., 2016; Wakeman, Horiguchi, 2017; Wakeman, Leander, 2012, 2013; Wakeman et al., 2014) и результаты моего исследования (Paskerova et al., 2018) указывают на то, что архигрегарины разделяются на несколько филогенетических линий. Разделение не соответствует таксономическому разделению по наличию или отсутствию мерогонии в жизненном цикле архигрегариин (Levin, 1971). Внутреннюю таксономию архигрегариин следует разрешать с использованием большого числа филогенетических маркеров, например, последовательности ДНК рибосомного оперона, с привлечением данных по тонкой морфологии (Paskerova et al., 2018).

3.8 Коэволюция архигрегариин и их хозяев

Молекулярно филогенетические исследования неоднократно демонстрировали согласование филогений архигрегариин и их хозяев: близкородственные архигрегарины паразитируют в близкородственных хозяевах. Это указывает на коэволюцию паразитов и их хозяев (Paskerova et al., 2018).

Глава 4 Бластогрегарины как самостоятельная ветвь споровиков

До настоящего времени бластогрегарины не имели определенного таксономического положения среди Apicomplexa, их филогенетические связи с другими споровиками были не ясны (Крылов, Добровольский, 1980; Adl et al., 2012; Levine et al., 1980).

4.1 Новые данные о строении и биологии бластогрегарин на примере *Siedleckia cf. nematoides*

S. cf. nematoides - кишечные паразиты полихеты *Scoloplos armiger* - длинные, уплощенные протисты с заостренным передним и закругленным задним концами, способные к активному изгибанию и скручиванию всем телом. Покровы представлены трехмембранной пелликулой с хорошо развитым гликокаликсом над и слоем продольно расположенных микротрубочек под ней. Микропоры располагаются в два продольных ряда по бокам бластогрегарины. Тело бластогрегарин можно подразделить на три отдела: мукрональный, вегетативный и генеративный. Мукрональный отдел характеризуется наличием органелл апикального комплекса и мукрональной вакуоли, служит для прикрепления к энтероциту хозяина. Второй отдел определяется обилием цистерн ЭПР и линейно расположенными ядрами. Третий отдел по расположению прогамных ядер отличается у макрогамонтов и микрогамонтов: один ряд крупных, широко раставленных ядер у макрогамонтов; несколько рядов мелких, неправильной формы ядер у микрогамонтов. Каждое прогамное ядро микрогамонта имеет по две связанные кинетосомы – это основа будущей двужгутиковой гаметы (Рисунок 3). Молекулярно-филогенетический анализ на основе последовательностей SSU рДНК показал, что в сколопосах Белого моря встречаются два вида-двойника сидлекий (Simdyanov et al., 2018).

4.2 Разнообразие бластогрегарин

Анализ морфологических и филогенетических данных по бластогрегарине *S. mesnili* из кишки полихеты *Orbinia latreillii* позволил создать новый род *Chattonaria* Simdyanov et al., 2018 в пределах нового семейства Chattonariidae Simdyanov et al., 2018 для этого паразита (Рисунок 3; Simdyanov et al., 2018). Приведена таблица диагностических признаков бластогрегарин.

4.3 Подвижность бластогрегарин

S. cf. nematoides двигаются независимо от субстрата и без явных признаков скользящего движения. Скорость и характер их подвижности изменялись под воздействием актин-(ясплакинолид, цитохалазин Д) и тубулин-модифицирующих (оризалин и колхицин) веществ. Сходно с архигрегарины, подвижность бластогрегарин основана на скольжении субпелликулярных микротрубочек, связанных между собой и с пелликулой микрофиламентами, относительно друг друга (Рисунок 4; Valigurová et al., 2017). Результаты влияния реагентов на подвижность бластогрегарин представлены в табличной форме.

4.4 Подвижность архигрегариин и бластогрегарин

Трофозоиты бластогрегарин и архигрегариин сохраняют микронемы, роптрии и компоненты глideosомы, присущие спорозоитам. При трансформации спорозоида в трофозоит происходит замещение субстрат-зависимого скольжения на субстрат-независимое изгибание всей клеткой; направленное движение вперед замещается непрогрессивной подвижностью. Органеллы апикального комплекса продолжают функционировать для создания зоны контакта между клеткой хозяина и мукроном паразита, чтобы обеспечить питание последнего путем мизоцитоза. Изгибательная подвижность нужна для постоянной смены среды вокруг паразитов.

4.5 Положение бластогрегарин в системе Apicomplexa

Бластогрегарины демонстрируют значительное морфологическое сходство с архигрегарины. Это согласуется с филогенетическим построением на основе последовательностей SSU рДНК, в котором бластогрегарины размещаются среди архигрегариин. По особенностям жизненного цикла (оогамия, двужгутиковые гаметы, нет гаметоцисты) бластогрегарины разделяют особенности кокцидиоморф, что согласуется с топологией филогенетических деревьев, построенных на основе последовательностей LSU рДНК и рибосомного оперона ДНК. Бластогрегарины должны рассматриваться как самостоятельная группа сравнительно рано дивергировавших спорозоитов с плезиоморфными чертами, присущими как кокцидиоморфам, так и архи- и эугрегарины. Предлагается следующая классификация этих паразитов: отряд Siedleckiida, класс Blastogregarinea, подтип Sporozoa, тип Apicomplexa (Simdyanov et al., 2018).

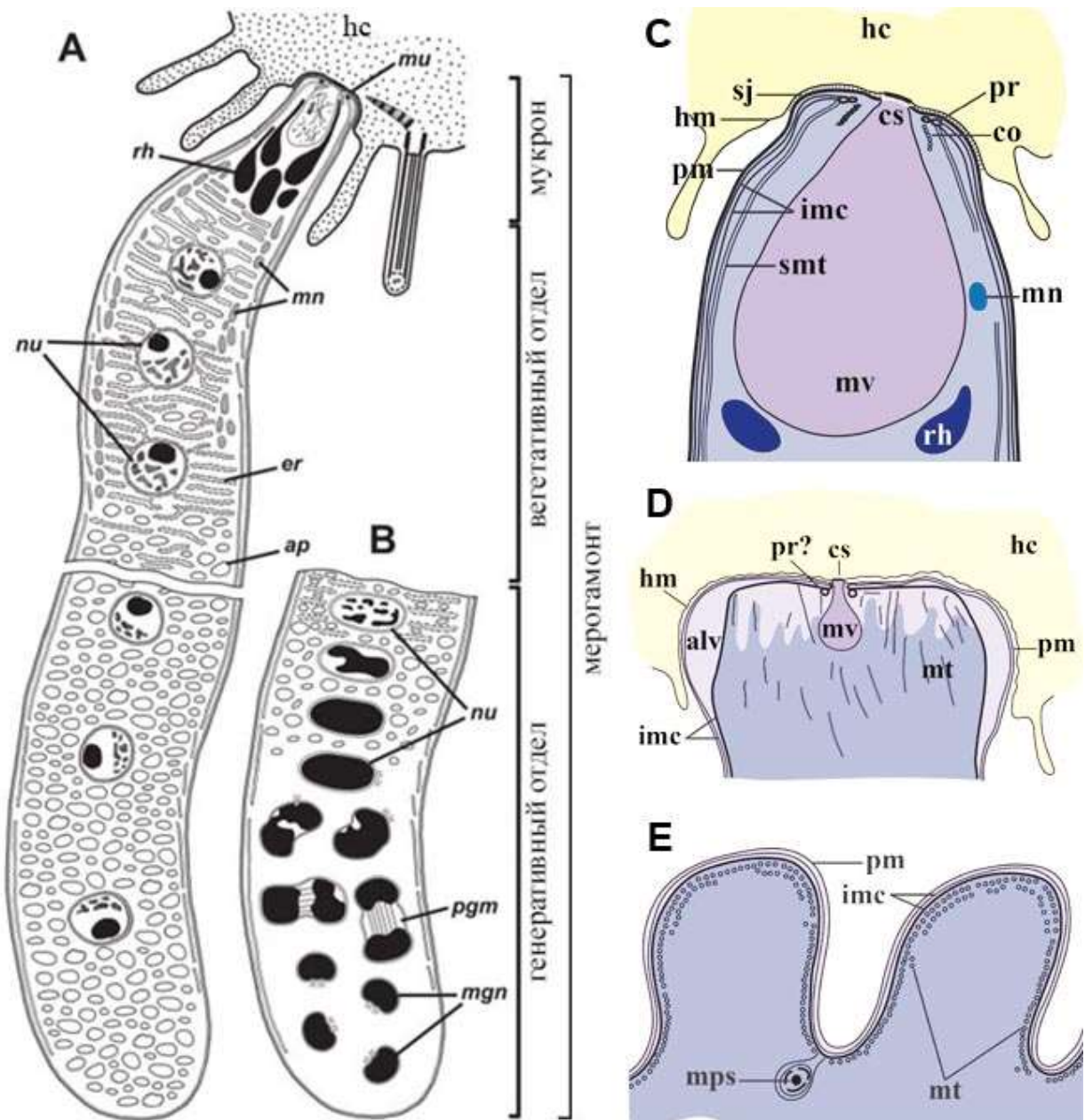


Рисунок 3 - Схема организации бластогрегарин (масштаб не соблюден)

А-В. Схемы организации общего строения меромакрогамонта (А) и генеративного отдела меромикрогамонта (В) на примере *Siedleckia cf. nematoides* (по Simdyanov et al., 2018 с изменениями). Отделы клетки бластогрегарин: мукрон или питающий отдел, вегетативный отдел, генеративный отдел. С. *Siedleckia cf. nematoides*: схема организации мукрона и кортекса (продольный срез). D-E. *Chattonaria mesnili*: схемы организации мукрона (D, продольный срез) и кортекса (Е, поперечный срез).

Обозначения: alv, альвеола между цитомембранами внутреннего мембранного комплекса пелликулы (у *C. mesnili*); ap, амилопектиновая гранула; co, коноид; cs, цитостом; er, эндоплазматический ретикулум; hc, энтероцит (клетка хозяина) с микровиллиями и ресничками на апикальной поверхности; hm, плазматическая мембрана клетки хозяина; imc, внутренний мембранный комплекс пелликулы; mgp, генеративные ядра, каждое с двумя кинетосомами; mn, мерогамонт; mps, везикула, связанная с микропороподобной структурой; mt, микротрубочки; mv, мукрональная вакуоль; mu, мукрон; nu, вегетативные ядра; pgm, прогамное деление (митоз) ядра меромикрогамонта; pm, плазматическая мембрана паразита; pr, полярное кольцо (у *C. mesnili* под вопросом); rh, роптрия; sj, септированный клеточный контакт между паразитом и клеткой хозяина (у *S. cf. nematoides*); smt, субпелликулярные микротрубочки.

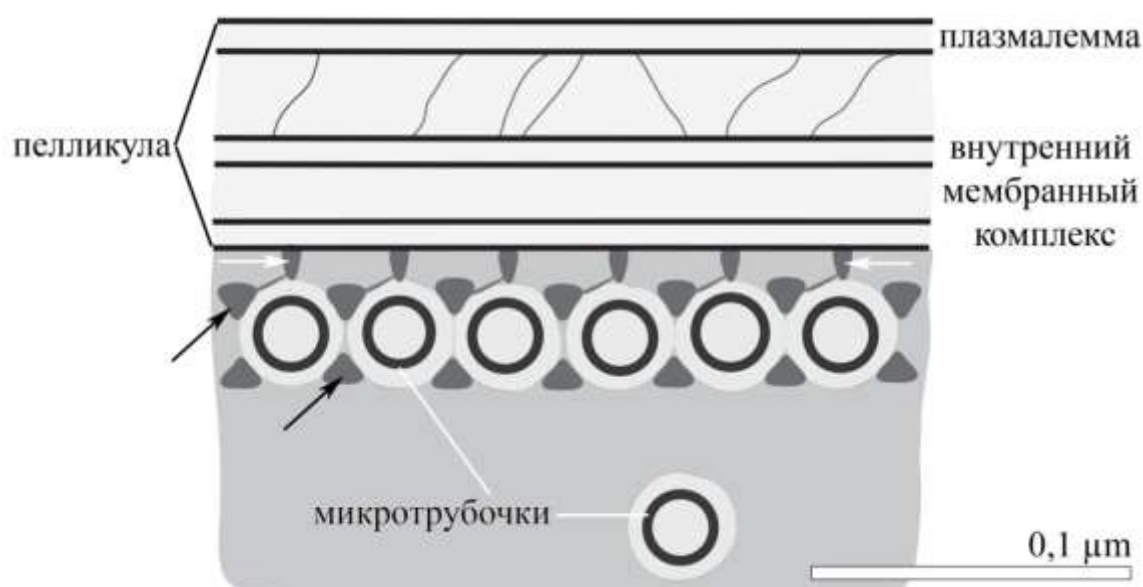


Рисунок 4 - Схема организации пелликулы и субпелликулярных микротрубочек у *Siedleckia nematoides*

Обозначения: белая стрелка указывает на белковый комплекс, встроенный во внутреннюю цитомембрану мембранного комплекса пелликулы и образующий связку с подлежащей субпелликулярной микротрубочкой; черные стрелки указывают на нитевидные структуры, спирально уложенные вокруг каждой микротрубочки (на поперечном срезе читаются как крупные частицы, расположенные по диагонали относительно друг друга). Обратите внимание, что вокруг каждой микротрубочки образуется «чехлик» - электронносветлое пространство цитоплазмы, с которым и взаимодействуют нитевидные структуры. Между плазмалеммой и внутренним мембранным комплексом располагаются филаментозные структуры.

Глава 5 Новые данные по несептированным эугрегариам семейства *Polyrhabdinidae* подтверждают, что эпимерит - инновация эугрегарин

Прикрепительные органеллы эугрегарин традиционно классифицировались как «мукрон» или «эпимерит» в зависимости от организации их клетки: несептированная или септированная соответственно (Levine, 1971). Такой подход требует морфологического подтверждения.

5.1 *Polyrhabdina pygospionis* и *P. cf. spionis* – несептированные эугрегарины с эпимеритом

Мое исследование показало, что исследуемые эугрегарины не обладают септами, а их прикрепительная органелла организована подобно эпимериту других ранее изученных несептированных и септированных эугрегарин (Рисунок 5; Paskerova et al., 2021). Приведена таблица диагностических признаков полирабдин.

5.2 Влияние гиперпаразитических микроспоридий *Metchnikovella spiralis* и *M. incurvata* на эугрегарину *Polyrhabdina pygospionis*

Микроспоридия *M. incurvata* интенсивно размножается прямо в цитоплазме своего хозяина, в то время как *M. spiralis* развивается в пределах объемных паразитофорных вакуолей (Frolova et al., 2023; Rotari et al., 2015; Sokolova et al., 2013, 2014). По моим данным мечниковеллы развиваются и в эпимерите, но никогда не затрагивают эпицит эугрегарины (Paskerova et al., 2021). Зараженные микроспоридиями эугрегарины способны к скольжению. У них появляются включения нового типа, которые, возможно, используются гиперпаразитами при их развитии (Frolova et al., 2023).

5.3 Филогенетический анализ подтверждает валидность семейства *Polyrhabdinidae*

P. pygospionis вместе с морфологически неидентифицированными эукариотами из морского грунта из разных географических точек формируют хорошо выраженную кладу –

семейство Polyrrhabdinidae - в пределах суперклады / надсемейства Ancoroidea Simdyanov et al., 2017 в филогенетических построениях по разным генным маркерам (Paskerova et al., 2021).

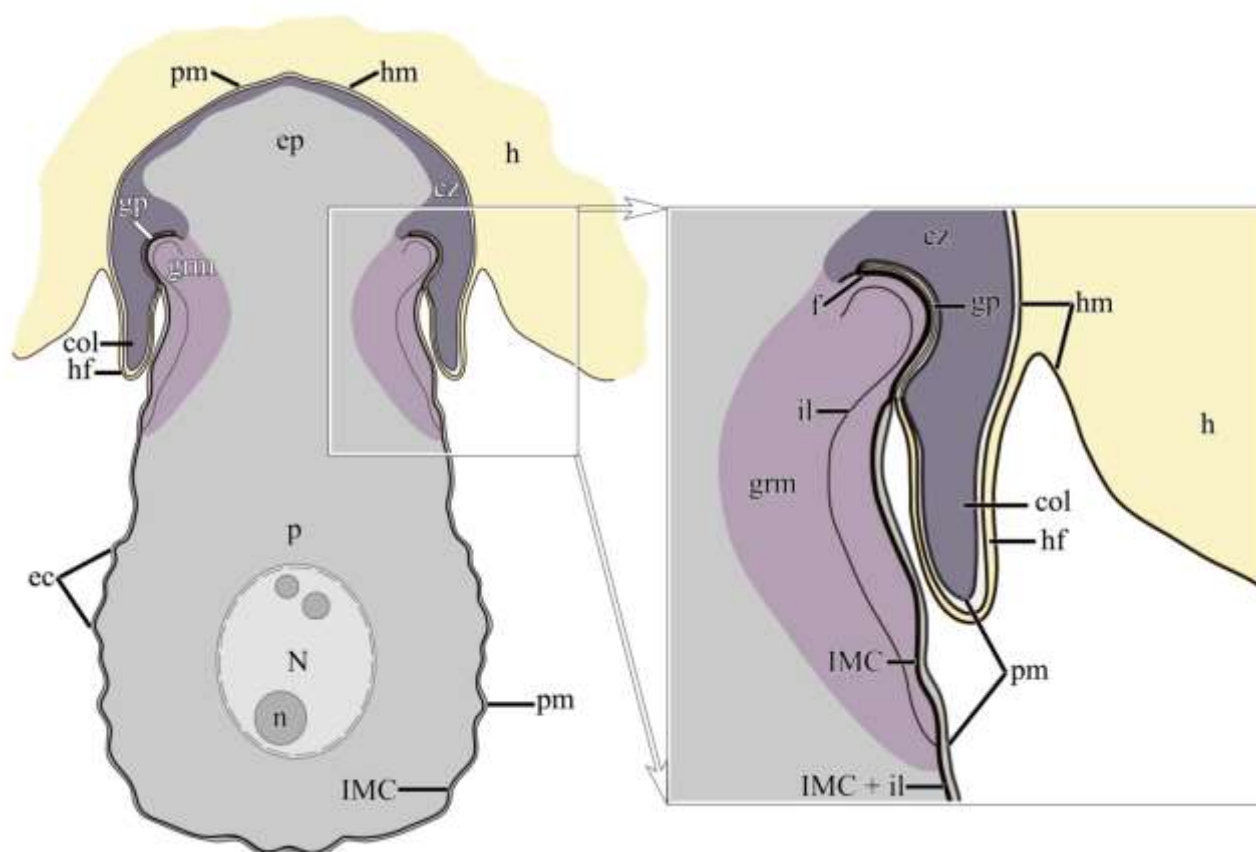


Рисунок 5 - Схема организации трофозойта несептированной эугрегарины рода *Polyrrhabdina* (на примере *P. rugospionis*), прикрепленной к кишечному эпителию хозяина с помощью эпимерита (масштаб не соблюден)

Обозначения: col, воротничок эпимерита; cz, кортикальная зона эпимерита; es, эпицитарные гребни; ep, эпимерит; f, фибриллярный слой; gm, гранулярный материал цитоплазмы; gr, круговая щель в основании эпимерита; h, клетка хозяина; hf, кольцевая складка, образованная апикальными выростами клетки хозяина; hm, плазматическая мембрана клетки хозяина; il, внутренняя ламина; IMC, внутренний мембранный комплекс; N, ядро; n, ядрышко; p, паразит; pm, плазматическая мембрана паразита.

5.4 Синапоморфии анкороид (Ancoroidea)

Полученные результаты и анализ литературы позволяют определить синапоморфии представителей надсемейства Ancoroidea: хорошо выраженный эпимерит и отсутствие связок внутренней ламины под основаниями эпицитарных гребней. В пределах надсемейства восстановлено семейство Polyrrhabdinidae Kamm, 1922 с обновленным диагнозом, выделено новое семейство Trollidiidae Paskerova et al., 2021 и обновлены диагнозы семейств Ancoridae Simdyanov et al., 2017 и Polyplicariidae Cavalier-Smith, 2014 (Paskerova et al., 2021).

5.5 Эпимерит – синапоморфия эугрегарин

Эпимерит является общей чертой организации всех эугрегарин, как септированных, так и не септированных. Мукрон – неотъемлемая часть архигрегаринов и бластогрегаринов – споровиков, сохранивших строение зоита на стадиях трофозойта и гамонта (Paskerova et al., 2018, 2021; Simdyanov et al., 2017, 2018). Полученные данные также подтверждают недавнюю ревизию диагноза отряда Eugregarinida Léger, 1900, emend. Simdyanov et al., 2017 (Simdyanov et al., 2017).

Глава 6 Подвижность грегариин как адаптация к обитанию в разных нишах в хозяине

Обобщенные данные по грегариинам поднимают вопрос о роли клеточной подвижности в адаптации паразитов к существованию в определенной нише в хозяине.

6.1 Целомические эугрегарины с разными типами подвижности: *Urospora ovalis*, *U. trivisiae* и *U. chiridotae*

U. ovalis и *U. trivisiae* обладают эпицитом, сходным образом организованным и типичным для эугрегариин. Однако для них характерна разная подвижность: метаболизирующая и скольжение соответственно. *U. chiridotae* – неподвижная эугрегариина с перестроенным эпицитом (Дякин, Паскерова, 2004; Diakin et al., 2016). Приведена таблица с диагностическими признаками исследуемых уроспор.

Скольжение трофозоитов эугрегариин связано с характерной организацией их покровов – наличием эпицитарных гребней с микрофиламентами в их вершинах, тогда как иные типы клеточной подвижности или ее отсутствие могут быть (но не обязательно) сопряжены с вторичными изменениями в строении эпицита.

6.2 Происхождение целомических грегариин

Молекулярно-филогенетический анализ на основе последовательностей SSU рДНК показал родство уроспорид с кишечными несептированными эугрегариинами надсемейства Lecudinoidea, способными к скольжению (Diakin et al., 2016; Paskerova et al., 2021; Valigurová et al., 2023). Кроме того, в моем исследовании было подтверждено филогенетическое положение *Selenidium melongena* среди архигрегариин из теребеллид на основе последовательностей гена 18S рРНК. Модифицированная организация этой архигрегариины и, как следствие, потеря клеточной подвижности, скорее всего, являются результатом перехода от кишечного к целомическому паразитизму (Paskerova et al., 2018).

Результаты моего исследования в совокупности с данными литературы показали, что возникновение целомического паразитизма происходило независимо в разных ветвях кишечных грегариин (архи- и эу-) и сопровождалось изменениями в строении их кортекса и, как следствие, подвижности.

6.3 «Целомический» путь выхода уроспор из хозяина во внешнюю среду

По сравнению с кишечными паразитами перед целомическими грегариинами стоит проблема выхода (эмиссии) из хозяина во внешнюю среду. Проведенное исследование бурых тел, извлеченных из целомической полости хозяина *T. forbesii*, показало, что большинство инкапсулированных в них гаметоцист уроспор не подвержено деструктивным изменениям: в ооцистах идет спорогония, хотя часто асинхронно в пределах одной гаметоцисты. Были обнаружены одиночные свободные спорозоиты вне гаметоцист, среди целомоцитов бурого тела. Строение таких спорозоитов идентично спорозоидам в пределах зрелых ооцист, заключенных в гаметоцисту. Суммируя, я предположила, что спорозоиты, рано развившиеся и вышедшие из гаметоцист, могут участвовать в аутоинвазии хозяина (Valigurová et al., 2023).

Несмотря на защитную роль бурых тел, целомоциты этих образований не оказывают существенного влияния на спорующую эугрегариин, а, напротив, позволяют паразитам, изолированным от новых атак иммунной системы хозяина слоями целомоцитов, достаточно долго существовать в целоме хозяина. Проведенное исследование подтвердило, что для целомических эугрегариин характерен «целомический» путь выхода во внешнюю среду: как правило, в момент повреждения или смерти хозяина (Valigurová et al., 2023).

6.4 Подвижность грегариин как адаптация паразитов к обитанию в определенной нише в хозяине

У бласто-, архи- и эугрегариин при их развитии из спорозоида в трофозоит происходит смена субстрат-зависимой подвижности клетки на субстрат-независимую. У бласто- и архигрегариин смена подвижности не сопровождается значительной перестройкой покровов, тогда как у эугрегариин трехмембранная пелликула теряет подлежащий кортикальный цитоскелет и формирует эпицитарные гребни с филаментами в их вершинах и внутренней

ламинаой под внутренним мембранным комплексом. Архи- и эугрегарины, заселяющие целом хозяина, могут претерпеть вторичную перестройку покровов с появлением нового типа или с утратой подвижности клетки. Перестройка организации покровов клетки и изменения подвижности в ходе трансформации спорозонта в трофозоит обусловлены внеклеточным существованием грегаринов в хозяине. Мелкие зоиты могут скользить в среде хозяина передним концом вперед за счет глидеосом, встраивающихся в пелликулу на переднем конце, протягивающихся вдоль и сбрасывающихся на заднем конце клетки. Крупные клетки (трофозоиты, гамонты и мерогамонты) должны обладать более эффективным механизмом подвижности для преодоления силы трения вязкой среды. У них появляется клеточная подвижность, основанная на динамической работе цитоскелета клетки. Как следствие изменения механизма подвижности при эндогенном развитии, трофозоит эугрегаринов может совершать не только поступательное скольжение вперед, но и поступательное движение назад без изменения формы клетки.

Глава 7 Эпицеллюлярный паразитизм среди кокцидий

Эпицеллюлярный паразитизм широко представлен у грегаринов (Gregarinomorpha). Однако этот вариант локализации в хозяине также встречается у базальных кокцидий (Coccidia, Coccidiomorpha). Исследование разнообразия вариантов взаимодействия базальных споровиков с клеткой хозяина является основой для понимания эволюции споровиков в целом. В этой главе представлены новые данные по стратегии паразитирования протококцидий рода *Eleutheroschizon*. Приведена таблица диагностических признаков элеутерошизонов. Полученные данные позволяют мне предложить новый тип эндопаразитизма среди споровиков — паразитизм в закрытой эпицеллюлярной нише, который конвергентно эволюционировал у *Eleutheroschizon* и *Cryptosporidium*.

7.1 Строение и стратегия прикрепления протококцидий к клетке хозяина на примере *Eleutheroschizon duboscqi* и *E. planoratum*

E. duboscqi и *E. planoratum* располагаются эпицеллюлярно на поверхности кишечного эпителия хозяина. Элеутерошизоны прикрепляются к апикальной части энтероцита хозяина с помощью расширенного переднего конца, имеющего сложное строение и видоспецифические особенности. Я впервые показала, что вокруг паразитов формируется так называемый паразитофорный мешок, в образовании которого участвуют выросты апикальной части клетки хозяина. Паразитофорный мешок вокруг паразитов имеет поры (Рисунок 6; Paskerova et al., 2023; Valigurová et al., 2015). Таким образом, локализация элеутерошизона оказывается переходной между настоящим эпицеллюлярным прикреплением внеклеточных паразитов, таких как грегарины, к клетке(ам) хозяина и внутриклеточным расположением в пределах паразитофорной вакуоли, как это характерно для большинства кокцидий, паразитирующих в тканях хозяина.

7.2 Филогенетическое положение *Eleutheroschizon duboscqi* and *E. planoratum* из беломорских полихет

Мультигенные филогенетические построения показали, что протококцидии *Eleutheroschizon* spp. занимают положение среди Coccidiomorpha, тогда как *Cryptosporidium* занимает сестринское положение к Gregarinomorpha (Janouškovec et al., 2019; Paskerova et al., 2023). Это свидетельствует о независимом происхождении закрытого эпицеллюлярного паразитизма у протококцидий и криптоспоридий.

7.3 Обоснование видов *Eleutheroschizon duboscqi* и *E. planoratum* из беломорских полихет

Приводятся морфологические и молекулярно-биологические обоснования правомерности определения *E. duboscqi* и выделения нового вида *E. planoratum* (Paskerova et al., 2023).

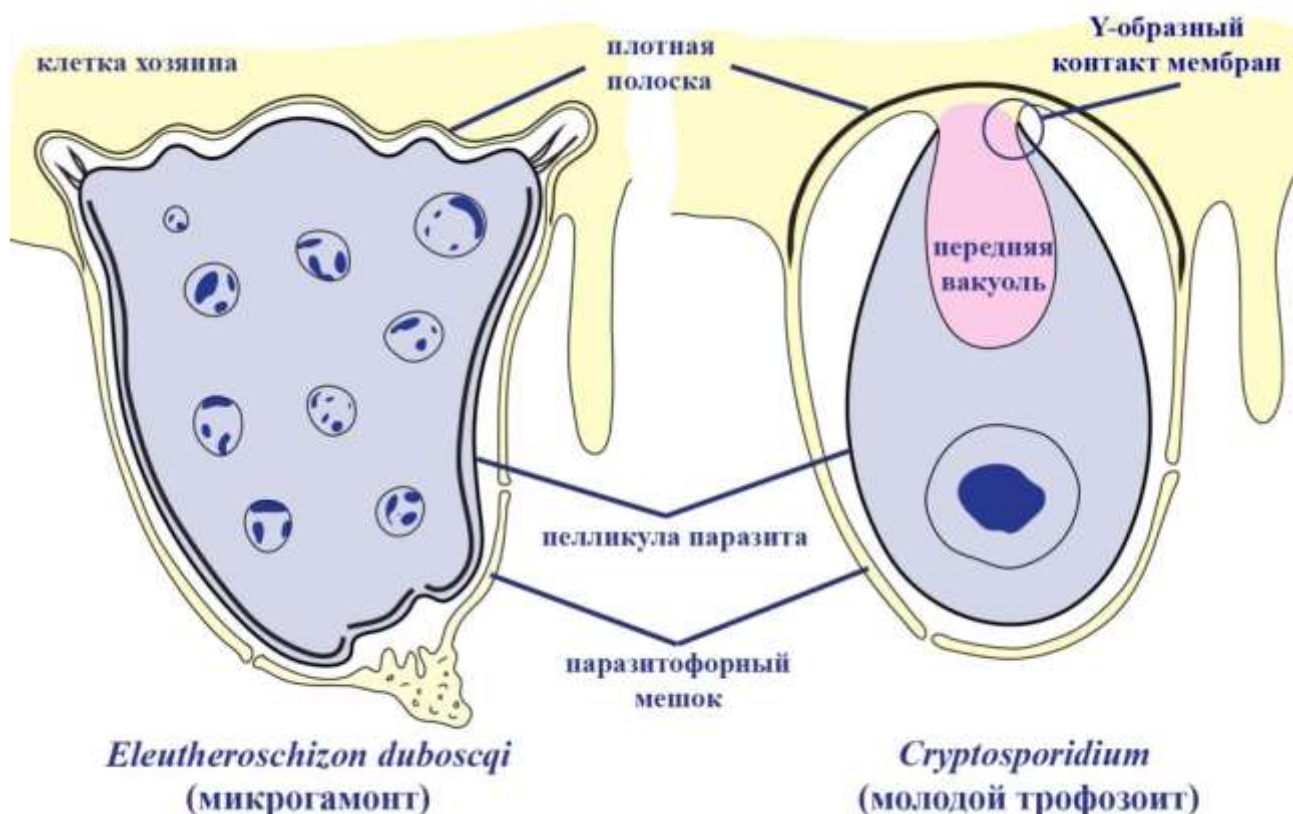


Рисунок 6 - Схема организации паразитофорного мешка при закрытом эпителиальном паразитизме у протококцидий (*Eleutheroschizon dusbosqi*) и криптоспоридий (масштаб не соблюден)

7.4 Сравнение эпителиальной локализации *Eleutheroschizon* и других споровиков

Подобно грегариам и криптоспоридиям, протококцидии рода *Eleutheroschizon* имеют сложно организованный аппарат прикрепления, который увеличивает поверхность контакта паразита и клетки хозяина. Однако, как и грегарины, протококцидии не пенетрируют клетку хозяина, и слияния цитоплазмы двух контактирующих клеток, как это наблюдается в случае криптоспоридий, не происходит.

Архигрегарины *Ditrypanocystis* sp., криптоспоридии и протококцидии рода *Eleutheroschizon* развиваются под защитой паразитофорного мешка, сформированного клеткой хозяина из слившихся выростов (ресничек, микроворсинок) на ее апикальной поверхности. Паразитофорный мешок вокруг криптоспоридий и протококцидий несет поры. Таким образом, вокруг эпителиально прикрепленного паразита формируется закрытая ниша, которая защищает его от агрессивной внутренней среды хозяина и одновременно осуществляет связь с этой средой через поры (Paskerova et al., 2023; Valigurová et al., 2015). Такой способ взаимодействия паразита с клеткой хозяина представляет собой новый тип эндопаразитизма — закрытый эпителиальный паразитизм, который конвергентно возник в разных филогенетических линиях споровиков. Обсуждаются варианты псевдоэпителиальной локализации у некоторых кокцидий.

Глава 8 Эндогенное развитие агамококцидий рода *Rhytidocystis* в полихетах

Установление связи агамококцидий с грегаридами, протококцидиями, кокцидиями и *Cryptosporidium* поможет понять эволюцию паразитизма среди споровиков в целом. На основе оригинального и опубликованного материала предложена таблица с диагностическими признаками ритидоцистид.

8.1 Особенности строения и локализации в тканях хозяина агамококцидий рода *Rhytidocystis* на примере паразитов беломорских полихет

Rhytidocystis dobrovoljskiji и *R. pertsovi*, паразиты кишки полихеты *Ophelia limacina*, начинают развитие в хозяине внутриклеточно, а по мере роста с изменением формы клетки (от полярной серповидной через неправильно округлую до правильно округлой) становятся внеклеточными. Известно, что начальное развитие паразитов внутри энтероцита идет прямо в цитоплазме клетки хозяина, позже формируется паразитофорная вакуоль вокруг него (Miroljubova et al., 2020). Изолированные из тканей хозяина растущие трофозоиты демонстрируют скольжение вокруг оси клетки.

8.2 Филогенетическое положение агамококцидий *Rhytidocystis dobrovoljskiji* и *R. pertsovi*

Филогенетические построения на основе почти полных последовательностей ДНК рибосомного оперона показали, что *R. dobrovoljskiji* и *R. pertsovi* вошли вместе с другими представителями рода *Rhytidocystis* в состав устойчивой суперклады более высокого порядка – *Rhytidocystis-Pseudoklossia-Margolisiella*. Эта клада представляет базальную группу (Eococcidia по Miroljubova et al., 2020) кокцидиоморф.

8.3 Эндогенное развитие агамококцидий сопровождается переходом от внутриклеточного к внеклеточному паразитизму и формированием дисперсионной стадии (ооцисты) для выхода во внешнюю среду

Внутриклеточная локализация ритидоцистисов на начальных этапах эндогенного развития, наиболее вероятно, является для них общей чертой. Развитие паразитофорной вакуоли вокруг внутриклеточного трофозоида может иметь место в результате обострения паразито-хозяинных отношений по мере созревания паразита. Подвижность созревающих трофозоитов, вероятно, помогает их выходу из клетки хозяина и чуть позже из кишечного эпителия для завершения эндогенного этапа жизненного цикла.

Известно, что агамококцидии синтезируют белки, участвующие в мейозе и формировании оболочки ооцисты у типичных кокцидий (Miroljubova et al., 2020). Трофозоиты ритидоцистид могут считаться макрогамонтами, которые при развитии накапливают запас питательных веществ, образуют стенкообразующие тельца и, в конечном итоге, становятся ооцистами. Проходит ли половой процесс агамококцидий по типу амфимиксиса или по типу партеногенеза – вопрос для будущих исследований.

8.4 Подвижность агамококцидий

Покровы ритидоцистисов организованы иначе, чем эпицит эугрегариин. Можно предположить, что выброс слизи и незначительное изменение формы клетки могут обеспечить небольшое скольжение клетки. Скольжение агамококцидий возникает независимо от направленного скольжения трофозоитов эугрегариин и требует дальнейшего исследования.

Глава 9 Распространенность пластид и их роль в паразитировании споровиков

Транскриптомный анализ показал, что архигрегариина *Selenidium pygospionis*, бластогрегариина *Siedleckia cf. nematoides*, агамококцидии *Rhytidocystis* sp. (из полихеты *Travisia forbesii*), *R. pertsovi*, протококцидия *Eleutheroschizon duboscqi* содержат пластиды, для которых характерны метаболические пути, сходные с таковыми пластид у *Toxoplasma* и *Plasmodium*. Пластиды утратили фотосинтез, однако, имеют почти полный биосинтез предшественников изопреноидов, гема и жирных кислот, а также биосинтез окислительно-восстановительной системы ферредоксина и железо-серных кластеров. Напротив, *Polyrhabdina pygospionis* и другие септированные и несептированные эугрегариины полностью утратили пластиды. Исключение составляет несептированная эугрегариина *Lankesteria abbotti* (Lecudinoidea), у которой сохранился биосинтез жирных кислот. Споровикам базальных линий свойственно обладать пластидами общего происхождения, в то время как *Cryptosporidium* и эугрегариины независимо утратили пластиды. При этом эугрегариины теряли пластиды как минимум дважды (Janouškovec et al., 2019).

Утрата пластиды у споровиков сопровождается становлением внеклеточного (полостного и тканевого) паразитизма. У паразитов, трофозоиты которых развиваются внутри клетки хозяина (хотя бы только на ранних этапах), пластиды, как правило, сохраняются. Криптоспоридии не имеют пластиды по сравнению с протококцидиями *Eleutheroschizon*, хотя эти паразиты демонстрируют сходный вариант паразитизма – закрытый эпицеллюлярный паразитизм. Криптоспоридии – паразиты, которые на эндогенной стадии развития создают непосредственный контакт с цитоплазмой энтероцита для получения жизненно важных метаболитов от хозяина. Протококцидии, напротив, не создают непосредственный контакт с энтероцитом и многие вещества способны синтезировать сами, тем самым демонстрируя большую независимость от метаболитов хозяина.

Заключение

Проведенные исследования могут быть подытожены следующим образом:

1. Трофозоиты архигрегариин сохраняют организацию зоита (спорозоида, мерозоида), передний конец (мукрон) которого прикрепляется к клетке хозяина (эпицеллюлярный паразитизм) и осуществляет мизоцитоз (подсасывание) содержимого цитоплазмы зараженной клетки и внутренней среды хозяина. «Аксиальный тяж», выявленный у некоторых архигрегариин (например, *Selenidium pygospionis*), представляет собой серию пищеварительных вакуолей, которые образуются (отшнуровываются) от мукрональной вакуоли и транспортируются вдоль тяжей микрофиламентов по всей клетке паразита.

2. У архигрегариин развитие трофозоида из спорозоида сопровождается сменой типа и механизма подвижности при сохранении плана строения клетки: от субстрат-зависимого однонаправленного скольжения всей клеткой за счет белковых адгезивно-моторных комплексов (глидеосом), встроенных в пелликулу, к субстрат-независимому непрогрессивному изгибанию и/или сокращению клетки на основе динамической работы субпелликулярных микротрубочек и связанных с ними микрофиламентов. При переходе от паразитизма в кишечнике к паразитизму в целоме хозяина трофозоиты архигрегариин (например, у *Selenidium melongena*) могут утрачивать клеточную подвижность в связи с реорганизацией их кортекса.

3. Трофозоиты архигрегариин (например, *Selenidium pygospionis*) могут иметь фазу внутриклеточного паразитирования в начале своего эндогенного развития. Это позволяет предположить происхождение внутриклеточных тканевых споровиков (Coccidiomorpha) от подобных архигрегариин.

4. Система отряда Archigregarinida Grassé, 1953, в котором объединяются как виды с мерогонией, так и без мерогонии в жизненном цикле, валидна. Род *Selenidioides* Levine, 1971, искусственно объединяющий виды без мерогонии, должен быть упразднен.

5. Бластогрегарины представляют собой самостоятельную группу споровиков, обладающих как уникальным признаком (многоядерный мерогамонт), так и признаками архигрегариин (мукрон, гладкая или складчатая пелликула, субпелликулярный слой (слои) микротрубочек, ооциста без спороцист, подвижность изгибательного типа на основе динамической работы субпелликулярных микротрубочек и микрофиламентов клетки) и кокцидий (двузгустиковые микрогаметы, оогамия, отсутствие стадий сизигия и гаметоцисты). Бластогрегарины должны быть классифицированы как самостоятельный класс Blastogregarinea Chatton et Villeneuve, 1936 (Apicomplexa: Sporozoa) с обновленным диагнозом. Класс включает отряд Siedleckiida Simdyanov et al., 2018 с двумя монотипическими семействами: Siedleckiidae Chatton et Villeneuve, 1936 и Chattonariidae Simdyanov et al., 2018.

6. Гипотеза, согласно которой эпимерит является синапоморфией эугрегариин, получила подтверждение на примере несептированных эугрегариин семейства Polytrabdinidae Kamm, 1922. Термин «мукрон» должен быть закреплен для обозначения переднего конца трофозоитов архи- и бластогрегариин, который наследуется от спорозоида, оснащен обычно органеллами апикального комплекса и участвует в мизоцитозе. Термин «эпимерит» должен быть закреплен для обозначения прикрепительной органеллы эугрегариин, образующейся de novo на вершине переднего конца спорозоида в ходе его трансформации в трофозоит.

7. Выяснен таксономический состав надсемейства Ancoroidea Simdyanov et al., 2017, объединяющего кишечных несептированных эугрегаринов из полихет. Анкороиды обладают хорошо развитым (выступающим) эпимеритом и характерным образом организованным эпицитом. Восстановлено семейство Polyhabdinidae Kamm, 1922 с обновленным диагнозом, выделено новое семейство Trollidiidae Paskerova et al., 2021 и обновлены диагнозы семейств Ancoridae Simdyanov et al., 2017 и Polyplacariidae Cavalier-Smith, 2014.

8. Направленное скольжение трофозоитов кишечных эугрегаринов связано с характерной организацией их покровов (наличие эпицитарных гребней с микрофиламентами в вершинах), возникающей в ходе трансформации спорозонта. Появление иных типов клеточной подвижности или ее утрата могут быть (но не обязательно) сопряжены с вторичными изменениями в строении покровов (эпицита), которые возникают при заселении эугрегаринов новых ниш в хозяине.

9. Подтверждена валидность таксономического объединения близкородственных лекудинид (Lecudinidae Kamm, 1922), кишечных паразитов морских беспозвоночных, и уроспориид (Urosporidae Léger, 1892), целомических паразитов морских беспозвоночных, в пределах надсемейства Lecudinoidea Simdyanov et al., 2017. Это свидетельствует в пользу того, что целомические несептированные эугрегарины произошли независимо и неоднократно от различных кишечных несептированных эугрегаринов.

10. Протококцидии рода *Eleutheroschizon* и архигрегарины *Ditrypanocystis* sp. характеризуются закрытым эпицеллюлярным паразитизмом, имеющим конвергентное сходство с таковым у *Cryptosporidium* spp. Этим споровикам свойственно вызывать изменения в апикальной части клетки кишечного эпителия хозяина, приводящие к формированию паразитофорного мешка, который изолирует паразита от среды кишечной полости хозяина.

11. По молекулярно-биологическим данным, агамококцидии рода *Rhytidocystis* относятся к ранней ветви кокцидиоморф. Это позволяет предположить, что внутриклеточная локализация (хотя бы на раннем этапе развития трофозонта) является анцестральной чертой для кокцидиоморф. У них появляются адаптации для существования в цитоплазме клетки хозяина (паразитофорная вакуоль формируется на поздних этапах развития трофозонта) и для выхода из клетки/ткани хозяина (скользящая непрогрессивная подвижность трофозонтов) при завершении эндогенного развития.

12. Споровикам базальных линий (архигрегарины, бластогрегарины, протококцидии, агамококцидии) свойственно обладать пластидами общего происхождения, в то время как *Cryptosporidium* spp. и эугрегарины независимо утратили пластиды. Эугрегарины теряли пластиды в ходе эволюции неоднократно, как минимум, дважды: Lecudinoidea – утрата пластидного генома с сохранением метаболических путей синтеза жирных кислот; остальные эугрегарины – полная утрата пластиды и ее метаболических путей.

Перспективы дальнейшей разработки темы могут быть следующими:

1. Продолжить исследование разнообразия архигрегаринов из морских беспозвоночных с целью решения вопроса о таксономии этой филогенетически разнообразной группы, представители которой сохранили однообразное строение (морфостазис).

2. Расширить знания о разнообразии и морфологии бластогрегаринов для выявления конвергентных путей развития этой группы по сравнению с другими базальными споровиками.

3. Начать комплексное исследование несептированных эугрегаринов группы Lecudinoidea для выявления/подтверждения синапоморфий эугрегаринов.

4. Продолжить исследование агамококцидий и других близких групп для установления филогенетических отношений и путей эволюции в пределах Coccidiomorpha.

Выводы

1. Представителям базальных линий споровиков – архигрегаринов, бластогрегаринов, несептированных эугрегаринов, протококцидий и агамококцидий (Sporozoa, Apicomplexa) – свойственны следующие анцестральные признаки: крупные,

- преимущественно подвижные трофозоиты, для которых характерен внеклеточный кишечный паразитизм в морских беспозвоночных.
2. У споровиков базальных линий внеклеточный кишечный паразитизм встречается в двух формах: открытый эпицеллюлярный паразитизм и закрытый эпицеллюлярный паразитизм. Первый характерен для архигрегариин, бластогрегариин и несептированных эугрегариин, а второй – для протококцидий рода *Eleutheroschizon* и архигрегарины *Ditrypanocystis* sp. Закрытый эпицеллюлярный паразитизм, конвергентно сходный с таковым у *Cryptosporidium*, возникает независимо у архигрегарины и протококцидий и может рассматриваться как более специализированный тип взаимодействия с хозяином по сравнению с открытым эпицеллюлярным паразитизмом.
 3. Адаптации к открытому эпицеллюлярному паразитизму проявляются при развитии трофозоида из спорозоида и заключаются в следующем:
 - формирование прикрепительной органеллы. У архигрегариин и бластогрегариин эта органелла образуется на основе переднего конца клетки (мукрона) с полным или частичным сохранением органелл апикального комплекса. У эугрегариин на переднем конце клетки возникает новый прикрепительный аппарат – эпимерит (синапоморфия);
 - смена типа и механизма подвижности при сохранении общего плана строения клетки у архигрегариин и бластогрегариин или в результате его перестройки у эугрегариин, приводящей к формированию эпипита (синапоморфия).
 4. Адаптации к закрытому эпицеллюлярному паразитизму проявляются при развитии трофозоида из спорозоида и заключаются в следующем:
 - развитие прикрепительного аппарата для закоривания паразита на апикальной поверхности клетки хозяина. У архигрегарины *Ditrypanocystis* sp. и криптоспорицидиумов прикрепительный аппарат возникает на основе мукрона спорозоида, обеспечивая непосредственный контакт между мембранами клеток паразита и хозяина, в то время как у элеутерошизонов он морфологически более сложный и возникает на основе части клетки, обращенной к энтероциту хозяина, без контакта между мембранами двух клеток;
 - образование закрытой паразитофорной ниши на апикальной поверхности энтероцитов хозяина. Архигрегарины *Ditrypanocystis* sp. вызывает модификацию ресничек, а элеутерошизоны и криптоспорицидии индуцируют рост выростов с последующим их слиянием в паразитофорный мешок вокруг паразита.
 5. Агамококцидии рода *Rhytidocystis* и некоторые архигрегарины рода *Selenidium* демонстрируют внутриклеточный паразитизм на ранних этапах развития трофозоида. Это позволяет рассматривать внутриклеточную локализацию на раннем этапе развития трофозоида как анцестральный признак *Coccidiomorpha*, унаследованный от архигрегариин.
 6. Переход от кишечного паразитизма к целомическому происходит у архигрегариин, агамококцидий и несептированных эугрегариин. У последних такой переход происходил неоднократно. Изменение локализации паразита в хозяине сопровождалось рядом вторичных морфофункциональных преобразований: перестройка покровов, утрата прикрепительной органеллы и полярности клетки, модификация или потеря подвижности.
 7. Пластиды споровиков базальных групп имеют общее происхождение. Для них характерен анцестральный метаболизм, сходный с таковым у пластид внутриклеточных кокцидиоморф (*Toxoplasma*, *Plasmodium*): утрата фотосинтеза, сохранение почти полного синтеза предшественников изопреноидов, гема и жирных кислот, окислительно-восстановительной системы ферредоксина и железосерных кластеров. Неоднократная утрата пластид у несептированных эугрегариин происходит в связи с их глубокой адаптацией к внеклеточному полостному и тканевому паразитизму.

**Список работ по теме диссертации,
опубликованных в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ**

1. Дякин, А. Ю. Морфология гамонтов *Urospora chiridotae* (Sporozoa: Gregarinomorpha: Eugregarinida) из голотурии *Chiridota laevis* (Echinodermata: Holothuroidea: Apoda) / А. Ю. Дякин, **Г. Г. Паскерова** // Паразитология. – 2004. – Т. 38 – № 3. – С. 225-238.
2. Butaeva, F. *Ditrypanocystis* sp. (Apicomplexa, Gregarina, Selenidiidae): the mode of survival in the gut of *Enchytraeus albidus* (Annelida, Oligochaeta, Enchytraeidae) is close to that of the coccidian genus *Gyptosporidium* / F. Butaeva, **G. Paskerova**, R. Entzeroth // Tsytologiya. – 2006. – V. 48. – N 8. – P. 695-704.
3. Sokolova, Yu. Ya. Fine structure of *Metchnikovella incurvata* Caullery and Mesnil 1914 (microsporidia), a hyperparasite of gregarines *Polyrhabdina* sp. from the polychaete *Pygospio elegans* / Yu. Ya. Sokolova, **G. G. Paskerova**, Yu. M. Rotari, E. S. Nasonova, A. V. Smirnov // Parasitology. – 2013. – V.140. – P. 855–867.
4. Sokolova, Yu. Ya. Description of *Metchnikovella spiralis* sp. n. (Microsporidia: Metchnikovellidae), with notes on the ultrastructure of metchnikovellids / Yu. Ya. Sokolova, **G. G. Paskerova**, Yu. M. Rotari, E. S. Nasonova, A. V. Smirnov // Parasitology. – 2014. – V. 141. – P. 1108-1122.
5. Rotari, Yu. M. Diversity of metchnikovellids (Metchnikovellidae, Rudimicrosporea), hyperparasites of bristle worms (Annelida, Polychaeta) from the White Sea / Yu. M. Rotari, **G. G. Paskerova**, Yu. Ya. Sokolova // Protistology. – 2015. – V. 9. – № 1. – P. 50-59.
6. Valigurová, A, Protococcidian *Eleutheroschizon duboscqi*, an unusual apicomplexan interconnecting gregarines and cryptosporidia / A. Valigurová, **G. G. Paskerova**, A. Diakin, M. Kováčiková, T. G. Simdyanov // PLoS ONE. – 2015. – V. 10. – N 4. – P. e0125063.
7. Diakin, A. Morphology and molecular phylogeny of coelomic gregarines (Apicomplexa) with different types of motility: *Urospora ovalis* and *U. travisiae* from the polychaete *Travisia forbesii* / A. Diakin, **G. G. Paskerova**, T. G. Simdyanov, V. V. Aleoshin, A. Valigurová // Protist. – 2016. – V. 167. – P. 279-301.
8. **Paskerova, G.G.** *Metchnikovella dogieli* sp. n. (Microsporidia: Metchnikovellida), a parasite of archigregarines *Selenidium* sp. from polychaetes *Pygospio elegans* / G. G. Paskerova, E. V. Frolova, M. Kováčiková, T. S. Panfilkina, E. S. Mesentsev, A. V. Smirnov, E. S. Nasonova // Protistology. – 2016. – V. 10. – N. 4. – P. 148-157.
9. Valigurová, A. Motility in blastogregarines (Apicomplexa): native and drug-induced organisation of *Siedleckia nematoides* cytoskeletal elements / A. Valigurová, N. Vaškovicová, A. Diakin, **G. G. Paskerova**, T. G. Simdyanov, M. Kováčikova // PLoS ONE. – 2017. – V. 12. – N. 6. P. e0179709.
10. Simdyanov, T. G. First ultrastructural and molecular phylogenetic evidence from the blastogregarines, an early branching lineage of plesiomorphic Apicomplexa / T. G. Simdyanov, **G. G. Paskerova**, A. Valigurová, A. Diakin, M. Kováčiková, J. Schrével, L. Guillou, A. A. Dobrovolskij, V. V. Aleoshin // Protist. – 2018. – V. 169. – N. 5. – P. 697–726.
11. **Paskerova, G. G.** Fine structure and molecular phylogenetic position of two marine gregarines, *Selenidium pygospionis* sp. n. and *S. pherusa* sp. n., with notes on the phylogeny of Archigregarinida / G. G. Paskerova, T. S. Miroljubova, A. Diakin, M. Kováčiková, A. Valigurová, L. Guillou, V. V. Aleoshin, T. G. Simdyanov // Protist. – 2018. – V. 169. – N. 6. – P. 826-852.
12. Kováčiková, M. Motility and cytoskeletal organisation in the archigregarine *Selenidium pygospionis* (Apicomplexa): observations on native and experimentally affected parasites / M. Kováčiková, **G. G. Paskerova**, A. Diakin, T. G. Simdyanov, N. Vaškovicová, A. Valigurová // Parasitology Research. – 2019. – V. 118. – N. 9. – P. 2651-2667.
13. Janouškovec, J. Apicomplexan-like parasites are polyphyletic and widely but selectively dependent on cryptic plastid organelles / J. Janouškovec, **G. G. Paskerova**, T. S. Miroljubova,

- K. V. Mikhailov, T. Birley, V. V. Aleoshin, T. G. Simdyanov // eLife. – 2019. – V. 8. – P. 49662.
14. Mioliubova, T. S. Polyphyletic origin, intracellular invasion, and meiotic genes in the putatively asexual agamococcidians (Apicomplexa *incertae sedis*) / T. S. Mioliubova, T. G. Simdyanov, K. V. Mikhailov, V. V. Aleoshin, J. Janouškovec, P. A. Belova, **G. G. Paskerova** // Scientific Reports. – 2020. – V. 10. – P. 1-17.
 15. Karpov, S. A. The aphelids, intracellular parasitoids of algae, consume host cytoplasm “from the inside” / S. A. Karpov, **G. G. Paskerova** // Protistology. – 2020. – V. 14. – N. 4. – P. 258–263.
 16. **Paskerova, G. G.** Evidence from the resurrected family Polytrabdinidae Kamm, 1922 (Apicomplexa: Gregarinomorpha) supports the epimerite, an attachment organelle, as a major eugregarine innovation // G. G. Paskerova, T. S. Mioliubova, A. Valigurová, J. Janouškovec, M. Kováčiková, A. Diakin, Yu. Ya. Sokolova, K. V. Mikhailov, V. V. Aleoshin, T. G. Simdyanov // PeerJ. – 2021. – V. 9. – P. e11912.
 17. Frolova, E. V. Diversity, distribution, and development of hyperparasitic microsporidia in gregarines within one super-host / E. V. Frolova, **G. G. Paskerova**, A. V. Smirnov, E. S. Nasonova // Microorganisms. – 2023. – V. 11. – N. 1. – P. 152.
 18. **Paskerova, G.G.** Morphological and phylogenetic study of protococcidians sheds light on the evolution of epicellular parasitism in Sporozoa (Apicomplexa), with the description of *Eleutheroschizon planoratum* sp. nov. / G. G. Paskerova, T. S. Mioliubova, A. Valigurová, V. V. Aleoshin, T. G. Simdyanov // Diversity. – 2023. – V. 15. – N. 7. – P. 863.
 19. Valigurová, A. Dispersal and invasive stages of *Urospora* eugregarines (Apicomplexa) from brown bodies of a polychaete host / A. Valigurová, A. Diakin, M. Seifertová, N. Vaškovcová, M. Kováčiková, **G. G. Paskerova** // Journal of Invertebrate Pathology. – 2023. – V. 201. – P. 107997.