ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ЗООЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Смирнов Петр Александрович

Морфофункциональные последствия перехода мирацидиев к пассивной стратегии заражения первого промежуточного хозяина

1.5.17. Паразитология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор Кирилл Владимирович Галактионов

Санкт-Петербург 2023

Оглавление

Введение 4
Глава 1. Обзор литературных данных 11
1.1 История исследований мирацидиев 11
1.2 Строение «активных» мирацидиев 12
1.2.1 Покровы
1.2.2 Мускулатура 13
1.2.3 Аппарат проникновения
1.2.4 Нервная система 15
1.2.5 Выделительная система 15
1.2.6 Генеративный материал 16
1.3 Строение «пассивных» мирацидиев 17
1.3.1 Мирацидии Bucephalata 17
1.3.2 Мирацидии Brachylaimata 19
1.3.3 Мирацидии Hemiurata 20
1.3.4 Мирацидии Opisthorchiata 22
1.3.5 Мирацидии Plagiorchiata 23
1.3.6 «Мирацидии» Notocotylidae 24
Глава 2. Материалы и методы 26
2.1 Сбор материала и хранение
2.2 Светооптическая микроскопия 27
2.3 Трансмиссионная электронная микроскопия 27
2.4 Экспериментальное заражение 28
Глава 3. Результаты и обсуждение 29
3.1 Мирацидии Bucephalata
3.1.1 Мирацидий Prosorhynchus squamatus (Bucephalidae) 29
3.1.2 Мирацидий Parvatrema affine (Gymnophallidae) 39

3.1.3 Мирацидий Steringophorus furciger (Fellodistomidae) 46
3.2 Мирацидии Hemiurata 53
3.2.1 Мирацидий Derogenes varicus (Derogenidae) 53
3.2.2 Мирацидий Bunocotyle progenetica (Hemiuridae) 60
3.2.3 Материнская спороциста <i>B. progenetica</i> 67
3.3 Мирацидий Opisthorchiata74
3.4 «Мирацидий» Notocotylidae 81
3.4.1 «Мирацидий» Paramonostomum alveatum 81
3.4.2 Материнская спороциста <i>P. alveatum</i>
3.5 Обсуждение
3.5.1 Мирацидии Bucephalata 87
3.5.2 Мирацидии Hemiurata 96
3.5.3 Мирацидии Opisthorchiata 104
3.5.4 «Мирацидий» Notocotylidae 108
Заключение112
Выводы 114
Список использованной литературы 115
Список публикаций по теме диссертации 125

Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

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

Digenea была Первые системы построены исключительно на основе морфологических признаков марит. По мере исследования других стадий жизненного цикла этих паразитов появлялись другие системы, учитывающие признаки церкарий (Lühe, 1909; La Rue, 1957) и даже партенит (Odening, 1974; Brooks et al., 1985). Между построенными классификациями накапливались противоречия, которые не были в полной мере разрешены и с применением молекулярных данных (Olson et al., 2003). На сегодняшний день отсутствует система дигеней, которая согласовывалась бы с представлениями 0 направлениях эволюции ИХ жизненных циклов И морфофункциональной специализации. Это BO многом обусловлено сильной «асимметрией» в аккумулированных данных по разным стадиям жизненных циклов этих паразитов и путях реализации их жизненных циклов.

Самыми малоисследованными стадиями жизненного цикла Digenea, безусловно, являются мирацидии и материнские спороцисты. Для многих крупных таксонов эти стадии, если и описаны, то очень поверхностно, а для некоторых – отсутствуют хоть какие-либо данные по их строению. Тем не менее, даже имеющихся сведений достаточно, чтобы дать следующую оценку: мирацидии и материнские спороцисты — это весьма разнообразные организмы, прошедшие через долгую историю взаимодействия с первым

промежуточным хозяином. Безусловно, в их строении и биологии скрыт важный филогенетический сигнал (Dobrovolskij, 1965; Добровольский и др., 1983; Семенов, 1991), который должен быть учтен при построении непротиворечивой системы Digenea, основанной на комбинации молекулярных и морфологических данных.

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

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

«пассивных» и «активных» личинок и наметить основные тенденции эволюции мирацидиев после перехода к пассивной стратегии заражения.

Цель и задачи исследования

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

Для достижения этой цели были поставлены следующие основные задачи:

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

Научная новизна

Впервые произведены детальные ультраструктурные реконструкции семи мирацидиев с пассивной стратегией заражения, включающие данные по всем клеточным системам этих организмов. Показано, что изменения, связанные со сменой стратегии заражения, фактически «разрушают» план строения, описанный для «активных» мирацидиев. Впервые прослежены тенденции преобразования покровов и мускулатуры, определен уровень редукции нервной и выделительных систем, определен состав генеративного материала у мирацидиев представителей крупных таксонов Digenea.

Данное исследование – первое, в котором производится попытка комплексного морфологического сравнения «активных» и «пассивных» мирацидиев на примере относительно большого числа представителей.

Методическая основа исследования

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

Основные положения, выносимые на защиту

- Переход мирацидиев от активной стратегии заражения первого промежуточного хозяина к пассивной влечет за собой кардинальные изменения их строения.
 Множественные переходы привели к формированию большого разнообразия устройства «пассивных» личинок.
- 2.Для мирацидиев Bucephalata характерно отсутствие единого плана строения. Несмотря на это, в строении мирацидиев представителей семейств Bucephalidae, Gymnophallidae и Fellodistomidae отчетливо проявляются общие черты,

определяемые их переходом к пассивной стратегии заражения первого промежуточного хозяина: уменьшение количества ресничных эпителиальных клеток, редукция сложной нервной системы, продольных мышц и протонефридиев, сдерживание развития зародышевого материала и реорганизация аппарата проникновения.

- 3.Одной из важнейших тенденций эволюции морфофункциональной организации мирацидиев Hemiurata следует считать замещение ресничек шипами на поверхности эпителиальных пластинок. Эпителиальные пластинки этих личинок фактически стали частью аппарата проникновения в кишечный эпителий моллюска-хозяина.
- 4. Мирацидиям Opisthorchiata присущ высокий уровень консервативности строения в пределах таксона.
- 5.«Мирацидии» Notocotylidae демонстрируют экстремальный уровень редукции соматических элементов, что стало возможным благодаря развитию особого «внешнего» аппарата проникновения оперкулярного тяжа, формируемого желточной мембраной сложного яйца.

Теоретическая и практическая значимость

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

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

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

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

Степень достоверности и апробация результатов.

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

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

Основные положения диссертации были представлены на конференциях:

• 63-ие Догелевские чтения, Санкт-Петербург, 2018

9

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

Структура и объем диссертации

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

Благодарности

Я выражаю глубокую благодарность [А.А. Добровольскому], который вдохновил меня на проведение данной работы и принимал активное участие в ее реализации на ранних этапах. Также благодарю своего научного руководителя К.В. Галактионова за всестороннюю поддержку, заинтересованность и множество комментариев к рукописи. В сборе материала, который лег в основу исследования, принимали участие Крупенко Д.Ю., Кремнев Г.А., Багров С.В., Николаев К.Е., чем существенно помогли его реализации.

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

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

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

Глава 1. Обзор литературных данных

1.1 История исследований мирацидиев

Первые описания мирацидия как стадии жизненного цикла трематод принадлежат Лейкарту (Leuckart, 1882) и Томасу (Thomas, 1883). Авторы, фактически синхронно охарактеризовав жизненный пикл печеночного сосальщика, первыми проиллюстрировали вылупляющихся из яиц «ресничных эмбрионов» (ciliated emryos/flimmernder Embryo). Термин «мирацидий» был предложен чуть позже. Бронн (Bronn, 1889) в энциклопедическом издании «Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs» пишет о несостоятельности обозначения личиночной стадии как «этапа развития» (эмбрион) и предлагает название «мирацидий» (др. греч. μειρακιδιоν – мальчик). С тех пор термин активно используется при описании жизненных циклов трематод.

С момента первого описания мирацидия появилось множество работ, включающих светооптические данные о строении этих ресничных личинок. Ранние работы полны неточностей и откровенно неправильных трактовок структур. Так, например, в ряде работ говорится о наличии у мирацидиев рудиментарного кишечника (Stiles, 1894; Coe, 1896). Со временем появились гистохимические методики, позволяющие на светооптическом уровне точно определять детали строения мирацидиев (Lynch, 1933); стал ясен состав тела некоторых личинок, для описания структур мирацидия устоялся единый терминологический аппарат. Помимо морфологических исследований, проводилось множество экспериментов, в рамках которых были определены особенности их поведения (Ullyot, 1936; Chernin, Dunovan, 1962; Mason, Flip, 1976; Prechel et al., 1976).

К середине 20-го столетия было уже точно известно о том, что мирацидии четко делятся на две категории по стратегии заражения первого промежуточного хозяина: активной и пассивной (Schauinsland, 1883; Walker, 1939). Активная стратегия заражения включает вылупление личинок из яиц в воду, поиск специфичного моллюска и внедрение в его покровы; «пассивные» личинки вылупляются только в кишке моллюска при случайном проглатывании яйца, заражение происходит путем внедрения в кишечный эпителий.

Качественным скачком в понимании строения мирацидия стали электронномикроскопические исследования «активных» личинок. К сегодняшнему дню детально изучены мирацидии *Fasciola hepatica* (Wilson, 1968,1969,1970,1971), *Schistosoma* *japonicum* (Pan, 1980), *Philophthalmus rhionica* (Тихомиров, 1983, 2000), *Echinostoma* spp. (Žďárská, 1995; Ataev et al., 2001; Pinheiro et al., 2005), *Gigantocotyle explanatum* (Dunn et al., 1986).

Множество светооптических описаний в сочетании с ультраструктурными данными сформировали весьма цельную картину устройства «активных» мирацидиев. Безусловно, все они характеризуются целым рядом особенностей, но построены по единому плану, который кратко описан ниже.



1.2 Строение «активных» мирацидиев

Рисунок 1. Схема строения «активного» мирацидия, выполненная на основе рисунка личинки *Isthmiophora melis* (Dönges, 1973). Желтый – эпителиальные пластинки, синий – гиподерма, зеленый – апикальная железа, оранжевый – теребраториум, серый – протонефридии, красный – генеративный материал.

1.2.1 Покровы

Покровы активных мирацидиев представлены ресничными эпителиальными пластинками – это уплощенные клетки, формирующие поперечные ряды (Wilson, 1968, Pan, 1980). Число рядов и число пластинок, составляющих отдельный ряд, вариабельно и описывается «эпителиальной формулой» (например: 6:8:4:2 – «четырехрядная» эпителиальная формула мирацидия Philophthalmus rhionica (Тихомиров, 1983)). Для большинства «активных» мирацидиев характерно наличие четырех рядов пластинок (Рисунок 1), но есть представители и с пятью (Albaret, Balbo, 1985), и с тремя (Goodchild, 1948) рядами. Эпителиальные пластинки не образуют «настоящий» эпителий, так как не связаны друг с другом специализированными клеточными контактами (Southgate, 1970). Целостность обеспечивается покровов связью эпителиальных пластинок с гиподермальными гребнями (тонкими длинными клеточными тяжами) при помощи При септированных контактов. внедрении мирацидия В моллюска-хозяина. эпителиальные пластинки сбрасываются, а гиподермальные гребни формируют тегумент, «растекаясь» по базальной пластинке (Southgate, 1970). Гиподермальные гребни связаны посредством цитоплазматических мостиков с цитонами – ядросодержащими клеточными телами, погруженными под слои мышц.

1.2.2 Мускулатура

Для «активных» личинок характерно наличие двух слоев мускулатуры: под кольцевыми мышечными волокнами залегают продольные (Wilson, 1969). Каждое мышечное волокно сформировано единственной клеткой, содержащей типичные для Plathelminthes неисчерченные миофиламенты (Wilson, 1969). Кольцевые мышцы крепятся к базальной пластинке гемидесмосомами, продольные – и к базальной пластинке, и к кольцевым клеткам (Pan, 1980). Для некоторых мирацидиев отмечены выпячивания содержащие ядра или даже миоцитоны, погруженные вглубь тела (Pan, 1980). Для «активных» мирацидиев характерна специализация мускулатуры переднего конца под выполнение функции прикрепления к моллюску и проникновения в него. Эта «передняя» мускулатура обеспечивает автономную работу теребраториума – хоботка, играющего важнейшую роль в проникновении в ткани моллюска (Collins et al., 2011).

1.2.3 Аппарат проникновения

Теребраториум – это комплексный орган, центральный элемент аппарата проникновения «активных» мирацидиев. Ha его поверхности располагаются разнообразные сенсорные элементы и открываются протоки желез проникновения (Swart, 1967; Тихомиров, 1983). Теребраториум (Reissinger, 1923) или апикальная папилла – подвижный хоботок, расположен на переднем конце (Рисунок 1); именно он вступает в контакт с поверхностным эпителием моллюска. Существуют разногласия в трактовке природы теребраториума, но наиболее достоверным сегодня считается определение теребраториума как видоизмененного гиподермального гребня (Семенов, 1991). Семенов (1991), на основании различий в строении хоботков F. Hepatica, Ph. Rhionica и S. mansoni, выделяет два типа теребраториума: телескопический и цилиндрический. Мирацидии представителей семейств Fasciolidae, Philophthalmidae и Echinostomatidae обладают телескопическим хоботком. За счет сокращения мышц-ретракторов хоботки этих личинок способны телескопически складываться или втягиваться в глубь тела. Для некоторых личинок даже описано хоботковое влагалище (Dönges, 1973). На поверхности теребраториума мирацидия *Ph. Rhionica* во ввернутом состоянии наблюдается множество складок, расположенных в соответствии с конфигурацией кольцевых мышечных клеток (Тихомиров, 1983). Цилиндрический хоботок характерен для мирацидиев Schistosomatidae. Его поверхность формирует множество цитоплазматических выростов. По мнению некоторых исследователей (Wright, 1971), такая структура может выполнять роль присоски при проникновении в ткани моллюска.

Аппарат проникновения «активных» мирацидиев включает несколько типов желез (Tikhomirov, 1983). Для большинства личинок характерно наличие апикальной железы, проток которой открывается на кончике теребраториума. Апикальная железа зачастую несет четыре ядра (Wilson, 1971; Dönges, 1973; Pan, 1980; Tikhomirov, 1983) – показано, что это результат слияния четырех клеток (Guilford, 1961). По бокам от апикальной железы у «активных» мирацидиев, как правило, располагается пара латеральных желез, открывающихся у основания хоботка (Wilson, 1970; Pan, 1980; Тихомиров, 1983). Помимо апикальной и латеральных желез, исследователи описывают также группу акцессорных желез, связанных протоками с первым поперечным гиподермальным гребнем (Wilson, 1971). Особого внимания, пожалуй, заслуживает аппарат проникновения мирацидиев семейства Sanguinicolidae. Передний конец этих личинок несет стилет (Schell, 1974;

McMichael-Phillips et al., 1992). МакМишель-Филлипс и др. (McMichael-Phillips et al., 1992) на примере мирацидия Sanguinicola inermis показали, что этот стилет представляет собой совокупность полых трубок, пронизывающих апикальную железу. Цитоплазма апикальной железы заполнена секреторными гранулами; здесь же имеются палочковидные тельца (rodlets), приуроченные к апексу железы и к основанию стилета. По бокам от апикальной железы имеется пара одноядерных латеральных желез. Помимо сангвиниколидных личинок, наличие стилета характерно И для мирацидиев Encyclometridae (Гинецинская, 1968), но детали его организации неизвестны.

1.2.4 Нервная система

Нервная система «активных» мирацидиев хорошо развита и устроена по типу классического ортогона (Wilson, 1969). В передней части тела залегает крупный церебральный ганглий, связанный с шестью продольными нервными стволами (Рисунок 1). От каждого ствола отходят нервы, направленные к переднему и заднему концам личинки. Нервы формируют контакты с мышцами и с нервными окончаниями (Pan, 1980). Нервные окончания имеются на поверхности первого поперечного гиподермального гребня и на поверхности теребраториума (Тихомиров, 1983). Сенсорные элементы всех крайне мирацидиев представлены исследованных «активных» разнообразными структурами, среди которых можно выделить как одиночные сенсиллы, так и комплексные органы чувств (Семенов, 1991). Для многих «активных» личинок (например: Fasciolidae, Echinostomatidae, Diplostomatidae) характерно наличие пары простых рабдомерных глазков (Lynch, 1933; Donges, 1964; Isseroff, Cable, 1968).

1.2.5 Выделительная система

Выделительная система «активных» мирацидиев протонефридиального типа (Рисунок 1). У всех описанных личинок есть два протонефридия классического для трематод строения (Lengy, 1960; Donges, 1964, 1973; Wilson, 1969; Pan, 1980; Семенов, 1991). Циртоцит связан с клеткой-каналом, которая представляет собой вытянутую извитую клетку, края которой связаны друг с другом септированным контактом. Клетка-канал, в свою очередь, соединяется при помощи септированного контакта с экскреторной

15

порой, которая располагается на гиподермальном гребне (Тихомиров, 1983; Pan, 1980). Для мирацидиев семейств Fasciolidae, Paramphistomatidae и Echinostomatidae отмечено наличие экскреторных пор на гиподермальном гребне, разделяющем последний и предпоследний ряды эпителиальных пластинок (Семенов, 1991). У личинок Philophathalmidae экскреторная пора находится на втором поперечном гребне, считая от переднего конца тела. Мирацидии Schistosomatidae несут поры на продольном гребне гиподермы, разделяющем пластинки третьего ряда (Семенов, 1991).

1.2.6 Генеративный материал

Организация генеративного материала мирацидиев весьма разнообразна у представителей разных групп. Различия сводятся к степени его развитости и являют собой яркий пример гетерохронии у трематод (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). На одном конце «гетерохронного» ряда стоят те мирацидии, в состав генеративного материала которого входят недифференцированные клетки. Недифференцированные клетки проникновения мирацидия плюрипотентны: после В моллюска ИХ потомки дифференцируются и как элементы генеративного материала, и как элементы сомы материнской спороцисты. На другом конце этого ряда можно расположить так называемых «живородящих» мирацидиев. Например, педогенетические мирацидии семейств Philophthalmidae (Тихомиров, 1983) и Cyclocoelidae (Taft, 1973) содержат единственную готовую к паразитизму редию. Эти личинки не внедряются и не претерпевают метаморфоз, а впрыскивают редию во внутреннюю среду потенциального хозяина. Между этими двумя крайностями есть множество разных вариантов организации генеративного материала, которые характеризуются разным количеством генеративных клеток и уже приступивших к развитию особей дочернего поколения (Рисунок 1). Важно отметить, что не так просто отличить недифференцированную клетку от генеративной: самым достоверным признаком генеративных клеток является наличие в их цитоплазме «нуажа» - структуры, наличие которой невозможно определить без использования ПЭМ (Klag et al., 1997).

1.3 Строение «пассивных» мирацидиев

В отличие от «активных» мирацидиев, которые весьма хорошо видны в оптический микроскоп, крайне миниатюризованные «пассивные» личинки исследованы гораздо хуже. Оптический микроскоп практически не позволяет разглядеть детали строения «пассивных» форм. Наблюдение за ними затруднено не только малым размером, но и толстой скорлупкой, в которую эти личинки заключены. Наличие скорлупки осложняет не только оптические наблюдения, но и подготовку «пассивных» мирацидиев к исследованиям методами электронной или конфокальной микроскопии. Через скорлупку плохо проникают фиксаторы, качественная заливка такого материала в вязкие среды практически невозможна. Решением этих методических трудностей можно считать применение методов замораживания под высоким давлением и последующего криозамещения. Джонс и др. (Jones et al., 2008) впервые использовали их для изучения оболочек яйца Schistosoma japonicum. При криофиксации на скорлупке яйца появляются трещины, через которые свободно проникают любые жидкости. Свидерски и др. (Swideski et al., 2010, 2013), пользуясь этой методикой, получили качественные срезы яиц Mediogonimus jourdanei и Brandesia turgida. Эта же методика и позволила нам получить качественные срезы «пассивных» мирацидиев, ультраструктурные описания которых приводятся в настоящей диссертации. Ниже приводятся данные по строению «пассивных» мирацидиев тех дигеней, для которых имеются хоть какие-то (зачастую крайне сомнительные) описания.

1.3.1 Мирацидии Bucephalata

Согласно наиболее часто используемой сегодня филогении дигеней (Olson et al., 2003), Bucephalata – монофилетический таксон, включающий три крупных семейства: Bucephalidae, Gymnophallidae и Fellodistomidae. Последние два семейства формируют группу Gymnophalloidea, сестринскую Bucephaloidea. Стоит заметить, что сами авторы этой филогении не гарантируют естественность этого таксона. История этого таксона полна противоречий и на данный момент точное положение этих трех семейств в системе трематод не определено.

Мирацидий Bucephalidae был описан светооптическими методами в ряде работ (Woodhead, 1929, 1930; Kniskern, 1952, Сулоева, 1999). Вудхэд (Woodhead, 1929, 1930), а за ним и Книскерн (Kniskern, 1952) описали личинок, несущих на своей поверхности неясной природы, «размахивая которыми» вылупившиеся «активные» «перья» мирацидии могут плыть в водной среде. Помимо «перьев», Книскерн (Kniskern, 1952) описал стилет на переднем конце мирацидия, что было использовано некоторыми авторами как аргумент в пользу родства семейств Bucephalidae и Brachylaimidae: для последних также описан стилетный мирацидий, несущий «перья» (Allison, 1943). В Добровольского (Galaktionov, Dobrovolskij, монографии Галактионова и 2003) приводится схема строения мирацидия Prosorhynchus squamatus, воспроизведенная по материалам Сулоевой (Сулоева, 1999). На этой схеме также изображен стилет, но никаких перьев у этого мирацидия не обнаружено – покровы несут реснички, расположенные на двух рядах эпителиальных пластинок. По данным авторов буцефалидная личинка однозначно относится к «пассивным», а описанное ранее «вылупление» они считают артефактом (так же, как и перья).

Нами была произведена полная ПЭМ-реконструкция мирацидия *Pr. squamatus* (Smirnov, Dobrovolskij, 2019). Показано, что строение этой личинки существенно отличает ее от «активных» форм: все системы подверглись существенным изменениям в связи с переходом к пассивной стратегии заражения. Подтвердилось сокращение рядов эпителиальных пластинок до двух. Большую часть внутреннего объема мирацидия занимает цитон гиподермы. В передней части личинки залегает апикальная железа, частью которой является стилет. Мирацидий *Pr. squamatus* несет крайне упрощенную нервную систему, сложенную из двух нейронов. Выделительная система редуцирована до состояния одного протонефридия. В задней части личинки залегают две недифференцированных клетки, которые мы рассматриваем как генеративный зачаток.

Удивительным образом, до нашего исследования мирацидия *Parvatrema affine*, ни один мирацидий семейства Gymnophallidae не был описан даже методами световой микроскопии. Мы произвели полную ПЭМ-реконструкцию личинки (Smirnov, Dobrovolskij, 2021), сравнив степень ее упрощения относительно «активных» форм и буцефалидного мирацидия.

Покровы мирацидия *P. affine* устроены необычным для мирацидиев образом: их слагают эпителиальные пластинки, связанные друг с другом специализированными

клеточными контактами. Задняя поверхность мирацидия сформирована безресничной клеткой, которую мы трактуем как протегумент. Большую часть объема личинки занимает апикальная железа. Помимо нее, в теле имеется две кристаллические железистые клетки, каждая из которых целиком заполнена единственной гранулой секрета. Нервная система редуцирована до того же уровня, что и у буцефалидной личинки, выделительная система отсутствует вовсе. Генеративный зачаток представлен одной недифференцированной клеткой.

Наше ультраструктурное описание мирацидия *Steringophorus* furciger (Fellodistomidae) также является первым для всего семейства (Smirnov, Gonchar, 2022). Полученная нами схема строения этой личинки существенно отличает ее от мирацидиев Gymnophallidae и Bucephalidae. Очень необычно организованы покровы личинки: эпителиальные пластинки формируют контакты и между собой, и с гиподермальными гребнями. Последние представлены спирально закрученными вдоль тела тяжами, отходящими от задней гиподермальной территориии. Кольцевая мускулатура развита более-менее полноценно, а продольная представлена лишь четырьмя клетками. Степень редукции нервной системы схожа с другими личинками Bucephalata, она также сформирована лишь двумя нейронами. Существенное отличие – отсутствие сенсорных окончаний, связанных с апикальной железой. Полностью редуцирована выделительная система, генеративный материал представлен двумя недифференцированными клетками. В опубликованной нами статье (Smirnov, Gonchar, 2022) приводится детальное описание феллодистомного мирацидия и его сравнение как с описанными ранее «пассивными» мирацидиями Bucephalata, так и с «активными» личинками.

Никаких других описаний мирацидиев Bucephalata sensu Olson et al. 2003 на момент написания этой рукописи опубликовано не было.

1.3.2 Мирацидии Brachylaimata

Существует несколько светооптических описаний мирацидиев Brachylaimata (Miller, 1936; Alicata, 1940; Allison, 1943, Robinson, 1949, Kagan, 1952). Во всех этих описаниях говорится о том, что большая часть поверхности личинок лишена ресничного покрова. Пожалуй, самое детальное описание принадлежит Каган (Kagan, 1952). Автор описал пять дискретно расположенных эпителиальных пластинок на поверхности

мирацидия Neoleucochloridium problematicum (Leucochloridiidae). Четыре из них находятся на одной стороне тела, одна – в задней части с противоположной стороны. Личинки представителей надсемейства Brachylaimoidea описаны в серии работ (Miller, 1936; Alicata, 1940; Allison, 1943, Robinson, 1949; и др.), и имеющиеся в них схемы весьма разнообразны. Льюис (Lewis, 1969), описывая жизненный цикл *Brachylaimus oesophagei*, отметил наличие на поверхности мирацидия двух V-образно расположенных групп ресничек. Ульмер (Ulmer, 1951) описал три схожие группы для личинки *Postharmostomum helici*. Вся поверхность личинки *Postharmostomum gallinum*, по наблюдениям Аликаты (Alicata, 1940), покрыта ресничками. Самая необычная схема личинки принадлежит Алиссону (Allison, 1943). Автор изобразил мирацидия *Leucochloridiomorpha constantiae* с шестью ресничными стволиками (rods/bars) на поверхности. Такие стволики, напоминающие перья птиц, расположены на схеме автора двумя поперечными рядами.

Существенную ясность в вопросы строения брахилемидного мирацидия внесла недавняя публикация анализа тонкого строения личинки *Ityogonimus lorum* (Swiderski et al., 2020). Несмотря на то, что фокус в этой работе смещен в сторону морофогенеза, в статье приводятся электронограммы зрелой личинки, по которым можно определить некоторые характеристики этого мирацидия. Подтвердилось то, что брахилемидный мирацидий по большей части «лысый», но никаких «перьев» он не несет. В задней части личинки в тегумент «встроены» ресничные эпителиальные пластинки, причем по краям эти пластинки ограничены длинными цитоплазматическими выростами тегумента (которые, вероятно, и создавали эффект «перьев»). У личинки *It. lorum* развита апикальная железа, но никаких структур, напоминающих стилет, не отмечено.

1.3.3 Мирацидии Hemiurata

Нетіигата – крупный таксон Digenea, единство которого опирается на многие морфологические признаки (Brooks et al., 1985). Актуальная схема эволюции дигеней (Olson et al., 2003), основанная на молекулярных данных, включает Hemiurata как монофилетический таксон с высокой поддержкой.

Один из морфологических признаков, объединяющий представителей разных семейств этой группы – наличие шипов на поверхности мирацидиев (Schauinsland, 1883; Looss, 1894; Baylis, 1938; Rankin, 1944; Hussey, 1945; Stunkard, 1956; Wootton, 1957; Self

20

et al., 1963). Исходя из довольно многочисленных светооптических описаний личинок Hemiurata шипы развиты в разной степени у представителей этого таксона. Шелл (Schell, 1975) в кратком сообщении пишет о том, что личинка Lecithaster salmonis полностью покрыта ресничками. Мадхави (Madhavi, 1978) отмечает, что покровы мирацидия Genarchopsis goppo также в большей степени представлены ресничным аппаратом, однако передний конец снабжен вооружением из шипов. Похожая картина характерна для мирацидия Hirudinella ventricosa (Hirudinellidae) (Murugesh, Madhavi, 1990), однако в этом случае реснички покрывают только переднюю часть личинки. Непосредственно на переднем конце авторы опять же наблюдали шипы, радиально организованные в три группы по четыре шипа. А вот ультраструктурно описанная Мэттьюсами (Matthews, Matthews, 1991) личинка Lecithochirium furcolabiatum лишена шипов; ее покровы представлены четырьмя ресничными эпителиальными пластинками, окружающими передний конец. Во всех остальных светооптических описаниях мирацидиев Hemiurata авторы отмечают только шипы на поверхности. Пластинки, несущие шипы, многократно описываются в составе покровов мирацидиев Azygiidae (Schauinsland, 1883; Looss, 1894; Hussey, 1945; Stunkard, 1956; Wootton, 1957, Anderson, Anderson, 1963). Шипастые мирацидии характерны и для Didymozoidae (Baylis, 1938, Self et al., 1963), и для Halipegidae (Rankin, 1944). Для всех этих личинок характерны шипы, покрывающие отдельные участки тела, а вот мирацидий Bunocotyle progenetica полностью покрыт «шипами» (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003).

До недавнего времени природа шипов на поверхности гемиуридных мирацидиев была совершенно неясна. Семенов (Семенов,1991) вообще сомневался в самой трактовке поверхностных структур личинок Hemiurata как шипов и выдвинул гипотезу, согласно которой они являются «сложными структурами типа мембранелл Ciliata». Нами был реконструирован мирацидий *Derogenes varicus*, и мы показали, что шипы располагаются на поверхности эпителиальных пластинок, «впаянных» в тегумент. Передняя часть тела мирацидия *D. varicus* способна вворачиваться за счет сокращения мышц-ретракторов и выворачиваться за счет сокращения кольцевой мускулатуры. Таким образом, как мы предположили, мирацидий способен нарушать целостность кишечного эпителия моллюска, проникая в его ткани.

1.3.4 Мирацидии Opisthorchiata

Существует несколько работ, в которых приводится светооптическое описание описторхиатного мирацидия (Faust, 1929; Vogel, 1934; Hsu, 1951; Perkins, 1956; Вышкварцева, 1969; Посохов, 1972; Shameem and Madhavi, 1988). Схемы, представленные авторами, весьма противоречивы, и единого мнения о строении мирацидия не существует. Судя по данным Вышкварцевой (1969), мирацидий Metorchis intermedius, несет два ряда ресничных эпителиальных пластинок. Железистый аппарат мирацидия представлен тремя железами: две двуядерные железы проникновения, расположенные одна за другой, и железа вылупления. Последняя «трубковидной» формы, ее проток дугообразно изогнут в передней части тела. По мнению автора, секрет этой железы расходуется во время выхода мирацидия из яйца. В задней части тела личинки расположены две генеративные клетки. Сома мирацидия представлена шестью-семью клетками, Вышкварцева (1969) отмечает наличие двух протонефридиев. Посохов (1972), исследовавший морфологические особенности фаз жизненного цикла Clonorchis sinensis, также отмечает наличие пары двуядерных желез в передней части тела мирацидия. На его схеме также отмечены железа вылупления, две крупные генеративные клетки в задней части тела и пристеночно расположенные соматические клетки. Схемы Фауста (Faust et al., 1929) и Фогеля (Vogel, 1934) по мирацидиям C. sinensis и Opisthorchis felineus частично противоречат и данным Вышкварцевой, и данным Посохова. Основное отличие заключается в полном сохранении «железы вылупления» (langgestreckte Drüsenzelle) у вылупившегося мирацидия на схемах обоих авторов. Фогель (Vogel, 1934) полагает, что эта железа, наряду с апикально расположенной клеткой, выполняет пенетрационную функцию. Также Фогель сомневается в железистой природе клетки, расположенной по центру. Эти сомнения связаны с тем, что автору не удалось обнаружить какого-либо протока. В работе отмечено, что эта клетка может быть генеративной. Всего на окрашенных препаратах Фогелю удалось обнаружить в мирацидии 10-12 ядер, преимущественно располагающихся в задней части тела. Однозначного вывода о природе клеток, содержащих «задние» ядра не делается, но, по мнению автора, причин выделять среди них генеративные нет.

1.3.5 Мирацидии Plagiorchiata

Plagiorchiata (sensu Odening, 1961) – крупнейшая ветвь эволюции трематод (Olson et al., 2001; Cribb et al., 2003). Судя по довольно многочисленным описаниям (Schell, 1961,1962; Dobrovolskij, 1965; Dronen, 1975; Добровольский и др., 1983; Галактионов, 1993; Galaktionov, Dobrovolskij, 2003), для всех представителей этой группы характерны «пассивные» мирацидии. К сожалению, на данный момент не опубликовано ни одной работы с детальным ультраструктурным описанием плагиорхиатной личинки. Тем не менее, даже имеющиеся схемы, основанные на светооптических наблюдениях, позволяют наметить план строения плагиорхиатной личинки.

Шелл (Schell, 1961,1962) и Добровольский (Dobrovolskii, 1965) фактически синхронно опубликовали во многом очень похожие схемы мирацидиев Haplometrana intestinalis, Glypthelmins quieta, Opisthioglyphe ranae, Haplometra cylindracea и Telorchis assula. По этим описаниям, в теле плагиорхиатных личинок имеются две крупные двуядерные железы, расположенные одна за другой. Такие железы занимают большую часть тела мирацидиев. На переднем конце эти железы открываются посредством бульбовидного расширения (бульбуса). Авторы трактуют эти структуры как железы проникновения. Шелл (Schell 1961) отмечает, что после внедрения мирацидия Н. Intestinalis в кишечный эпителий моллюска Physa ampullacea железы «перестают быть видимыми, теряя железистые очертания». Из этого факта автор делает вывод, что секрет описываемых железистых клеток используется во время проникновения. По бокам от желез проникновения на схемах авторов изображены еще две колбасовидные безъядерные клетки, протоки которых тянутся к бульбовидному расширению. Секрет этих железистых клеток, по описанию Шелла, схож с секретом задней двуядерной железы. Также Шелл отмечает, что такие клетки значительно лучше видны у невылупившихся личинок и предполагает, что их секрет используется во время или сразу после вылупления. Добровольский (Dobrovolskii, 1965), описав точно такие же структуры у личинок Haplometra cylindracea и Telorchis assula, обозначает их как железы вылупления. Дронен (Dronen, 1975) для мирацидия Haematolechus показал несколько отличающуюся организацию железистого аппарата. На его схеме две двуядерные железы «слились» в единую четырехъядерную. Железы вылупления, по его наблюдениям, характеризуются разными размерами. Такие же различия наблюдал Добровольский (Dobrovolskij, 1965) на железах личинок Paralepoderma cloacicola. Достаточно сильно от описанных схем отличается строение мирацидия Microphalloidea (Галактионов, 1993). Железистый аппарат мирацидиев представлен одной апикальной железой, являющейся результатом слияния двух клеток.

Применив методику серебрения, А.А. Добровольский (Dobrovolskij, 1965) показал на личинке *Paralepoderma cloacicola* наличие трех эпителиальных пластинок, слагающих каждый ряд (эпителиальная формула – 3:3), тем самым обозначил для этих личинок сокращение числа рядов и слагающих их эпителиальных пластинок, связанное с переходом к пассивной стратегии заражения. Схожая картина отмечена этим автором (Dobrovolskij, 1965) для личинок *Haplometra cylindracea* и *Opisthioglyphe rastellus*.

работах А.А. Добровольского (Dobrovolskij, Много внимания В 1965. Добровольский и др., 1983, Galaktionov, Dobrovolskij, 2003) уделено разнообразию состава генеративного материала плагиорхиатных мирацидиев. Согласно этим данным, мирацидиев Plagiorchiata можно условно разделить на три группы. Границы этих групп определены степенью развития генеративных клеток. К первой группе автор относит тех мирацидиев, в теле которых не имеется ни одной зрелой генеративной клетки. Ко второй – личинок с одной «более или менее выраженной» генеративной клеткой. Третья группа объединяет мирацидиев с двумя генеративными клетками. А.А. Добровольский также разделяет виды, для личинок которых характерен постоянный состав генеративного материала, и виды, у личинок которых число ядер варьирует. Сравнив соотношения зрелых генеративных и недифференцированных клеток у разных видов Plagiorchiata, автор строит морфологический ряд по степени «зрелости» мирацидиев. Такой ряд трактуется как проявление гетерохронии. Все выводы сделаны на основании различий размеров и степени спирализации хроматина ядер на тотальных препаратах плагиорхиатных личинок.

1.3.6 «Мирацидии» Notocotylidae

«Мирацидий»¹ Notocotylus 24ttenuates был исследован методами просвечивающей электронной микроскопии (Murrils et al., 1985). По этому описанию все соматические элементы мирацидия полностью редуцированы. Фактически, в яйцевой оболочке

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

заключена материнская спороциста. Поверхность спороцисты сформирована тегументом, под слоем которого в полости лежит «как минимум одна» генеративная клетка. По описанию Муррилса с соавторами (Murrils et al., 1985), помимо спороцисты, яйцо *Notocotylus 25ttenuates* содержит две клетки: одна из них богата гликогеном, другая ассоциирована с оперкулярным тяжом – вытянутой структурой, огибающей тело спороцисты. Проанализировав результаты экспериментов по вылуплению «мирацидиев» *N. 25ttenuates* in vitro, Муррилс с соавторами выдвинули предположение, согласно которому оперкулярный тяж играет ключевую роль в проникновении спороцисты во внутреннюю среду моллюска. Было показано (Murrils et al., 1985), что после раскрытия крышечки яйца, оперкулярный тяж «выстреливает» наружу, сильно вытягиваясь в длину. Авторы предполагают, что этот «выстрел» способен пробить кишечный эпителий моллюска, а спороциста поступает в его гемоцель, проходя через канал, сформированный оперкулярным тяжом.

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Сбор материала и хранение

Материалы для данной работы были собраны в ходе полевых сезонов 2017-2020гг в окрестностях УНБ «Беломорская» (<u>http://mbs.spbu.ru/ru/</u>) Сбор материала осуществлялся в соответствии со всеми нормами: птицы были получены от местных охотников, отлов рыбы осуществлялся без использования сетей. Полученные в результате паразитологических вскрытий дигенеи были определены до вида с использованием имеющихся определителей.

Мариты *Prosorhynchus squamatus* были получены при паразитологических вскрытиях бычков рода *Myoxocephalus*.

Мариты Steringophorus furciger были получены из пищеварительной системы камбалы Pleuronectes platessa.

Мариты *Parvatrema affine* были получены из задних отделов пищеварительной системы кулика-сороки *Haematopus ostralegus*.

Мариты Derogenes varicus были получены при паразитологических вскрытиях трески Gadus morhua.

Мариты Cryptocotyle lingua были получены из пищеварительной системы полярной крачки Sterna paradisaea.

Мариты Bunocotyle progenetica были получены из моллюска Peringia ulvae.

Мариты *Paramonostomum alveatum* были получены из пищеварительной системы кряквы *Anas platyrhynchos*.

Все собранные мариты были помещены в физиологический раствор Рингера (для холоднокровных) для мацерации и получения яиц. В таком виде материал был доставлен в лабораторию Кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ, где он хранился при температуре 4°С. В лаборатории была произведена общая оценка состояния яиц и степени развития личинок в яйцах методами световой микроскопии (DIC) с использованием микроскопа LeicaDM2500. В зависимости от степени развития личинок часть материала была оставлена на дозревание, часть подготовлена для фиксации. И яйца с развивающимися личинками, и яйца со зрелыми личинками были переведены в морскую воду соленостью 20 промилле.

2.2 Светооптическая микроскопия

В процессе работы производился постоянный мониторинг состояния яиц методами световой микроскопии (DIC) с использованием микроскопа LeicaDM2500. Зрелыми личинки признавались тогда, когда в течение двух недель с ними не происходило никаких заметных преобразований. Все этапы развития (если таковые вообще имелись) снимались на камеру Nikon DS-Fi1.

Мирацидии *C. Lingua* и *B. progenetica* исследовались на мазках кишечного содержимого моллюсков *Littorina littorea* и *Peringia ulva*е соответственно. Моллюски были обильно накормлены инвазивными яйцами, после чего помещались в теплую морскую воду (20°С). Спустя 30-40 минут производилось вскрытие моллюсков. Отпрепарированная кишка помещалась на предметное стекло и разрезалась на маленькие кусочки.

2.3 Трансмиссионная электронная микроскопия

Яйца со зрелыми личинками Pr. squamatus, S. furciger, P. affine, D. varicus, C. lingua, B. progenetica, P. alveatum были заморожены под высоким давлением с помощью станции криофиксации Leica EM HPM100. В качестве криопротектора использовался 20% раствор BSA на морской воде (20 ppt). Зафиксированные образцы хранились в жидком азоте при температуре -120°С. Криозамещение осуществлялось в станции Leica EM AFS2. В качестве фиксирующего «коктейля» использовался 1% раствор OsO4 + 0.5% УА на ацетоне. Полученные образцы были проведены по возрастающей безводном концентрации EPON 812 с увеличенными сроками. Все этапы пробопоготовки к ТЕМпроизводились на базе ресурсного СПбГУ «Развитие исследованию центра молекулярных и клеточных технологий» (http://biomed.spbu.ru/).

С заключенных в блоки личинок на ультратоме Leica UC6 были получены серии ультратонких срезов. Изготовление серий осуществляли следующим образом:

- с заточенного участка блока, содержащего личинок, производили серии срезов толщиной 60 нм;

- после получения такой серии с блока «срезали» 2-3 полутонких среза толщиной 200-250 нм;

- затем процедура повторялась.

Такая методика позволила получить прерывистые серии срезов личинок в разных проекциях. Полученные серии были исследованы с помощью электронного микроскопа FEI Morgagni268 при ускоряющем напряжении 80kV. Фотографии были обработаны с использованием графического редактора Adobe Photoshop. По полученным фотографиям были выполнены схемы-реконструкции личинок. Схемы и вклейки были оформлены в графическом редакторе CorelDRAW. Вся электронно-микроскопическая часть работы производилась на базе ЦКП «Таксон» Зоологического института PAH (https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3038/).

2.4 Экспериментальное заражение

После окончания полевого сезона 2020 г. На кафедре зоологии беспозвоночных СПбГУ производилось экспериментальное заражение моллюсков *Peringia ulvae* яйцами *B. progenetica* и *P. alveatum*. Моллюсков содержали в чашках Петри (D=10 см) при комнатной температуре. Вскрытие экспериментальных моллюсков проводили через сутки, через неделю и через две недели после контролируемого скармливания моллюскам яиц. Найденные при экспериментальном заражении партениты были исследованы на оптическим микроскопе LeicaDM2500, после чего зафиксированы 2,5% раствором глютаральдегида на какодилатном буфере. На следующий день после фиксации было проведено осмирование материала 1%-м раствором OsO4 и его заливка в эпоксидную смолу (EPON 812). В ЦКП «Таксон» Зоологического института РАН были произведены серии срезов (Leica UC6) с этого материала и их исследование с помощью электронного микроскопа FEI Morgagni268 (80kV).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1 Мирацидии Bucephalata

3.1.1 Мирацидий Prosorhynchus squamatus (Bucephalidae)

Светооптические наблюдения

Яйца. содержащие зрелых мирацидиев Pr. squamatus эллиптической формы с четко выраженной крышечкой. Приблизительные размеры яйца: 30x15 мкм. Мирацидий занимает примерно 2/3 объема яйца, его передний конец упирается в крышечку, его задний конец крупными хорошо сдавлен двумя различимыми желточными клетками. Цитоплазма этих клеток выглядит прозрачной, И содержит небольшое светопреломляющее тельце. Приблизительные размеры мирацидия: 25x10 мкм. Поверхность личинки покрыта ресничками. Передний конец мирацидия несет стилет.



Рисунок 2. DIC-микрофотография яйца *Prosorhynchus squamatus*, содержащего мирацидия. Масштаб: 10 мкм.

Детали внутреннего устройства на светооптическом уровне не различимы, видны лишь отдельные ядра, окруженные железистым содержимым и две округлые клетки в задней части мирацидия (Рисунок 2). При сдавливании яйца поверхностным стеклом мирацидии активизировались, сокращая и вытягивая свое тело.



Рисунок 3. Схема-реконструкция мирацидия *Prosorhynchus squamatus*. Сокращения: аж — апикальная железа; аш — шапочка апикальной железы; гг — гиподермальный гребень; км — кольцевая мышечная клетка; кп – канал протонефридия; мпс — протрактор стилета; н — нервная клетка; ндк — недифференцированная клетка; пм — продольная мышечная клетка; с — стилет; ткп — терминальная клетка протонефридия; цг — гиподермальный цитон; экп — экскреторная пора; эп — эпителиальная пластинка.

Реконструкция мирацидия, основанная на комбинации оптических и ультраструктурных данных приведена в Рисунке 3.

Ультраструктурные данные

<u>Покровы</u>

Покровы личинки представлены двумя поперечными рядами безъядерных ресничных эпителиальных пластинок (Рисунок 4). Пластинки первого ряда значительно длиннее пластинок второго ряда. Точное число пластинок, слагающих каждый ряд, установить не удалось из-за наличия множественных интердигитаций между соседними клетками (Рисунок 4b). Эпителиальные пластинки подостланы базальной пластинкой (Рисунок 4d). Несмотря на большую площадь соприкосновения эпителиальных пластинок, они не связаны специализированными клеточными контактами. Ресничный аппарат эпителиальных пластинок хорошо развит (Рисунок 4а). Реснички классического строения (9x2+2) располагаются на пластинке продольными рядами. Основание каждой реснички окружено кольцевой складкой (Рисунок 4а). Хорошо развит корешковый аппарат ресничек: от кинетосомы каждого жгутика отходит единственный поперечно исчерченный корешок (длина: ~2 мкм), направленный к переднему концу тела. Все корешки «скручены в трубочку» таким образом, что на поперечном срезе представлены замкнутым округлым контуром с полостью внутри (Рисунок 4d). В цитоплазме эпителиальных пластинок богато представлены митохондрии и гранулы гликогенподобного полисахарида. Изредка на срез попадают единичные микротрубочки. Чаще всего они приурочены к краям эпителиальных пластинок. Края каждой эпителиальной пластинки прикреплены посредством септированных котнтактов к гиподермальным гребням (Рисунок 4d). Все гиподермальные гребни личинки являются производными одного цитона, занимающего большую часть тела личинки (Рисунок 5а). Цитон двуядерный, с сильно развитым шероховатым ЭПР; цитоплазма заполнена гранулами секрета. Секреторные гранулы палочковидной формы, порядка 1,5-2 мкм в длину. Кортикальный слой гранулы характеризуется более электронно-плотным веществом, центральная часть гранулы – менее. Между центральной частью и кортексом гранулы имеется узкая полоска электронно-светлого вещества. Гранулы секрета различаются по степени зрелости, причем более молодые оказываются более светлыми, более зрелые – темными. Самые зрелые гранулы характеризуются также наличием в их содержимом



Рисунок 4. Стенка тела мирацидия *Prosorhynchus squamatus*. а — тангентальный срез через покровы передней половины тела мирацидия *Prosorhynchus squamatus*; b — тангентальный срез через покровы задней половины тела мирацидия; с — срез через переднюю половину мирацидия; d — поперечный срез, показывающий септированные десмосомы (белые стрелки), соединяющие эпителиальные пластинки с гиподермальными гребнями, и гемидесмосомы мышечных клеток (черная стрелка). Сокращения: аж — апикальная железа; гг — гиподермальный гребень; гр – граница эпителиальной пластинки; жм — желточная мембрана; к — косо исчерченный корешок; км — кольцевая мышечная клетка; пм — продольная мышечная клетка; р — реснички; скл – кольцевые складки вокруг ресничек; цг — гиподермальный цитон; шаж — шапочка апикальной железы; эп — эпителиальная пластинка. Масштаб: 1 мкм.

Помимо гранул в цитоплазме цитона встречаются аппараты Гольджи, митохондрии и гранулы гликоген-подобного полисахарида. Цитон гиподермы связан с

32

гиподермальными гребнями цитоплазматическими мостиками (Рисунок 5а). Судя по всему, такие мостики располагаются в трех зонах личинки: на переднем конце, на границе между двумя поперечными рядами пластинок и на заднем конце. Гиподермальные гребни, разделяющие пластинки переднего ряда, находятся несколько поодаль от цитона. Связь в этом случае осуществляется посредством

мощного протока (Рисунок 4с), армированного по периферии часто расположенными микротрубочками. Такой проток подходит к гиподермальным гребням в передней четверти тела личинки, где и связывается с ними. Здесь продольно расположенные гиподермальные гребни содержат цитоскелет из микротрубочек. На границе между двумя рядами пластинок можно наблюдать поперечно расположенный гиподермальный гребень, формирующий кольцо. Это кольцо также связано с цитоном узким мостиком. Точное расположение эпителиальных пластинок и гиподермальных гребней на заднем конце тела личинки определить не удалось, однако и здесь также наблюдаются цитоплазматические мостики.

Цитоплазма гиподермальных гребней ничем принципиально не отличается от цитоплазмы цитона. Она содержит гранулы секрета и гликоген-подобный полисахарид, изредка встречаются митохондрии. Таким образом, совокупность сложной сети из гиподермальных гребней, цитона и соединяющих их цитоплазматических мостиков является единой синцитиальной системой.

<u>Мускулатура</u>

Под базальной пластинкой располагаются два слоя мышечных волокон (Рисунок 4c,d). Внешний – слой кольцевых волокон – представлен не менее, чем девятью весьма широкими безъядерными клетками. Миофиламенты внутри клеток не упорядочены. Посредством гемидесмосом (Рисунок 4d) мышечные элементы крепятся к базальной пластинке. В цитоплазме клеток встречаются гранулы гликоген-подобного полисахарида, митохондрии. Внутренний слой представлен единственной продольно ориентированной мышечной клеткой (Рисунок 4c). Крепясь к базальной пластинке вблизи от переднего конца мирацидия, эта клетка тянется к заднему концу вдоль одной из сторон мирацидия. На серии поперечных срезов видно, что впереди она весьма широка (6-7мкм), к заднему концу расщепляется на два узких отростка. Помимо этого элемента продольной

мускулатуры, в теле мирацидия также имеется продольно расположенная мышечная клетка, связанная с аппаратом проникновения личинки (см. ниже).



Рисунок 5. Гиподермальный цитон и аппарат проникновения мирацидия *Prosorhynchus squamatus*. а – косой срез, показывающий обширный гиподермальный цитон (цт), заполненный секреторными гранулами (белые стрелки указывают на гиподермальные гребни, черные – на кольцевые мышечные клетки); b – сагиттальный срез через передний конец мирацидия (белая стрелка указывает на нервное окончание); с – поперечный срез, показывающий стилет внутри цитоплазмы апикальной железы (белая стрелка указывает на гиподермальный гребень); d – косой срез, показывающий основание стилета и мышечную клетку-протрактор стилета, связанную с ним. Сокращения: аж — апикальная железа; гг — гиподермальный гребень; кс — кончик стилета; нк — нервная клетка; но — нервный отросток; ост — основание стилета; ст — стилет; цт — гиподермальный цитон; эп — эпителиальная пластинка; я— ядра гиподермального цитона. Масштаб: 1 мкм.

Аппарат проникновения

В передней трети тела личинки расположена единственная грушевидная апикальная железа (Рисунок 5b). Ее размеры весьма невелики: от заднего края железы до ее апекса – порядка 6-7 мкм. Основная часть железы связана с апексом протоком (Рисунок 4c), армированным часто расположенными микротрубочками. Железа проникновения безъядерная, большая часть цитоплазмы заполнена гранулами секрета. Эти гранулы

палочковидной формы и в целом схожи с секреторными гранулами цитона гиподермы. Их отличает чуть меньший размер (длина: 0,5 мкм); содержимое гранул железы проникновения более электронно-плотное и рыхлое, в нем никогда не наблюдается кристаллоподобных образований. В задней части железы наблюдаются митохондрии. Апекс железы проникновения представлен апикальной шапочкой – уплотнением кортикальной зоны цитоплазмы (Рисунок 4с). Здесь, под цитоплазматической мембраной, обращенной вовне, имеется слой электронно-плотного вещества толщиной 0,1 мкм. Края апикальной шапочки соединяются с эпителиальными пластинками первого ряда десмосомой. Поверхность апикальной шапочки неровная и характеризуется сложным расположением локализующихся на ней выступов. Самым крупным выступом апикальной шапочки является кончик стилета мирацидия (см. ниже). Железа проникновения мирацидия Pr. squamatus снабжена стилетом (Рисунок 5a, Рисунок 6b), который является продолжением кортикального уплотнения апикальной шапочки, погруженным в глубь тела личинки. Стилет узкий и весьма длинный (0,4х8мкм) – превышает длину самой железы. На поперечном срезе через стилет видна его полость (Рисунок 5с). Ближе к апексу железы проникновения стилет непосредственно включен в клеточное тело железы. К заднему концу стилет приобретает своеобразную «самостоятельность» и выходит за пределы клетки. Проксимальный конец стилета формирует подобие вилочки: здесь он разветвляется на несколько крошечных зубцов (Рисунок 5d). Здесь же к стилету крепится мускул-протрактор стилета. Последний представляет собой упоминавшийся выше продольный мышечный тяж, который крепится одним концом к базальной пластинке близ апекса железы проникновения, другим – к вышеупомянутой вилочке. В месте соединения со стилетом мускул формирует чашечку, обволакивающую основание стилета. Мышечная клетка здесь соединяется со стилетом в нескольких зонах посредством клеточных контактов неясной природы. Между этими зонами «вклинивается» разветвленный отросток нервной клетки. Таким образом, формируется своеобразный «цветок» иннервации мускула-протрактора (Рисунок 6b).



Рисунок 6. Нервная система мирацидия *Prosorhynchus squamatus*. а — срез через кончик стилета, показывающий кольцевые десмосомы (белые стрелки), связывающие сенсорные папиллы с шапочкой апикальной железы; b — «цветок иннервации». Белые стрелки указывают на нервные отростки, «встраивающиеся» в мышечную клетку-протрактор; с — нервные отростки (но) с микровезикулами; d — «узелок» рядом с нейромышечным контактом (белая стрелка). Сокращения: кс — кончик стилета; мпс — мышечная клетка-протрактор; нк — нервная клетка; но — нервный отросток; паж — проток апикальной железы; сен — сенсорная папилла; уз — нервный «узелок»; цт — гиподермальный цитон; эп — эпителиальная пластинка. Масштаб: 1 мкм.

Нервная система

Нервная система мирацидия *Pr. squamatus* представлена двумя мультиполярными нейронами, расположенными в передней половине тела. Клеточное тело одного из них
находится в непосредственной близости к основанию стилета (Рисунок 6b). Один из отростков, как было сказано выше, тянется к чашечке мускула-протрактора. Его ветви, входящие в чашечку, формируют с мускулом контакты типа «gap junctions». Таким образом, справедливо трактовать этот отросток как эффекторный. Другой отросток тянется к переднему концу тела личинки, где формирует сенсиллу (Рисунок 6а), «впаянную» в апикальную шапочку железы проникновения. Цитоплазма этого сенсорного отростка содержит многочисленные гранулы нейромедиатора неизвестной природы (Рисунок 5b, 6a). Гранулы эллиптической формы, размером 0,3-0,4 мкм, заполнены веществом средней электронной плотности. Сенсилла цилиарного типа, прикреплена к железе проникновения кольцевой десмосомой. На срезах удалось наблюдать лишь ее кинетосому (Рисунок ба). Помимо двух описанных отростков, как нам удалось установить, имеется еще один раздваивающийся отросток, тянущийся вдоль тела личинки под базальной пластинкой. Тело второй нервной клетки расположено сразу за телом первой. Точную геометрию и число ее отростков установить не удалось. Однако, судя по всему, один из ее отростков также формирует сенсиллу, пронизывающую апикальную шапочку железы проникновения. Другие тянутся вдоль тела личинки под базальной пластинкой. В области кольцевых мышечных клеток эти отростки формируют своеобразные узелки. В месте таких узелков наблюдаются нейромышечные контакты (Рисунок 6d).



Рисунок 7. Выделительная система мирацидия *Prosorhynchus squamatus*. а — срез, показывающий положение протонефридия (белая стрелка); b — большое увеличение циртоцита и клетки канала, связанной с ним контактом (стрелка); с — поперечный срез через клетку канала, показывающий три реснички в его просвете. Стрелка указывает на септированную десмосому, связывающую края клетки канала; d — экскреторная пора. Стрелки указывают на контакты между порой и гиподермальным гребнем. Сокращения: гт — гиподермальный гребень; кк — клетка канала; км — мышечная клетка; ндк — недифференцированная клетка; ц — циртоцит; цт — гиподермальный цитон; экс — экскреторная пора; эп — эпителиальная пластинка. Масштаб: 1 мкм.

Выделительная система

Выделительная система личинки характеризуется наличием единственного протонефридия. Терминальная клетка расположена посередине тела мирацидия, как бы вдавлена в гиподермальный цитон (Рисунок 7а). Терминальная клетка безъядерна, олигоцилиарна: несет 3-4 реснички (Рисунок 7b,c), направленные в просвет клетки-канала. Клетка-канал (Рисунок 7c) не имеет ядра и характеризуется типичной для трематод морфологией: ее просвет формируют уплощенные отростки, края которых «сшиваются» десмосомами. На границе между передним и задним рядом эпителиальных пластинок находится экскреторная пора (Рисунок 7d). Пронизанная системой тонких

канальцев клетка, крепясь к гиподермальному гребню десмосомой, открывается на его поверхности. Под базальную пластинку отходит небольшой отросток, основная часть экскреторной поры связана с клеткой-каналом септированным контактом.



Рисунок 8. Генеративный материал мирацидия *Prosorhynchus squamatus*. а — расположение недифференцированных клеток; b — недифференцированные клетки при большом увеличении. Сокращения: брк – безресничная клетка; ндк — недифференцированная клетка; цт — гиподермальный цитон; я – ядро недифференцированной клетки. Масштаб: а — 2 мкм; b — 1 мкм.

Генеративный материал

В задней половине мирацидия располагаются две недифференцированные клетки (Рисунок 8). Эти клетки эллиптической формы, несут ядра, богатые гетерохроматином. Цитоплазма этих клеток заполнена вакуолями неясной природы и свободными рибосомами. Также здесь имеются митохондрии и гранулы гликоген-подобного полисахарида. Недифференцированные клетки не формируют контактов ни друг с другом, ни с другими клетками мирацидия.

3.1.2 Мирацидий Parvatrema affine (Gymnophallidae)

Реконструкция мирацидия, основанная на комбинации оптических и ультраструктурных данных приведена в Рисунке 9. Приблизительные размеры мирацидия *P. affine*: 10x20 мкм. Личинка заключена в эллиптическое яйцо, стенка скорлупки довольно тонкая, прозрачная; передний полюс яйца снабжен крышечкой. Мирацидий покрыт ресничками только на передние две трети, задний конец не несет ресничек и плотно прилегает к стенке яйца. В передней части личинки видны два овальных тела с прямоугольными включениями, лежащими продольно в их центре. Эти тела окружены крупной клеткой с зернистым содержимым (Рисунок 10b). Другие детали строения мирацидия на светооптическом уровне не различимы.



Рисунок 9. Схема-реконструкция мирацидия *Parvatrema affine*. Сокращения: аж – апикальная железа; аш – апикальная шапочка; брк – безресничная клетка (протегумент); кж – кристаллические железы; км – кольцевые мышечные клетки; н – нейрон; ндк – недифференцированные клетки; он – отросток нейрона; пк – проток кристаллических желез; эп – эпителиальные пластинки.

Покровы

Покровы представлены двумя поперечными рядами ресничных эпителиальных пластинок по две клетки каждый (Рисунок 10а, 11а). Клетки переднего и заднего рядов расположены друг относительно друга в шахматном порядке. Пластинки занимают передние 2/3 личинки. Покровы задней трети представлены



Рисунок 10. Общий план и покровы мирацидия *P. affine*. а – сагиттальный срез через мирацидия, стрелки указывают на кольцевые мышечные клетки, звездочкой отмечен проток кристаллических желез, гликогенподобные гранулы обведены в кружок, стопки гранул секрета – в овал. Масштаб: 5 мкм; b – DICмикрофотография мирацидия в яйце. ПК – передний конец, ЗК – задний конец. Масштаб: 5 мкм; с – связь между эпителиальными пластинками, черная стрелка указывает на "gap junction", звездочкой отмечена десмосома, белая стрелка указывает на исчерченные корешки. Масштаб: 1 мкм; d – связь между эпителиальной пластинкой и клеткой протегумента, черная стрелка указывает на "gap junction", звездочкой отмечена десмосома, белая стрелка указывает на исчерченный корешок. Масштаб: 1 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; аш – шапочка апикальной железы; кж – кристаллическая железа; км – кольцевые мышечные клетки; н – нейрон; п – проток кристаллической железы; паж – проток апикальной железы; пт – клетка протегумента; p – реснички; эп – эпителиальная пластинка; я – ядро протегумента. безресничной клеткой (протегумент), строение которой значительно отличается от строения пластинок. Эпителиальные пластинки безъядерные. Вся поверхность пластинки покрыта ресничками, организованными в продольные ряды. В промежутках между ресничками наблюдаются весьма крупные (до 1,5 мкм) неупорядоченно расположенные микровилли. От кинетосомы каждой реснички отходит единственный исчерченный корешок. Контур корешка на поперечном срезе подковообразной формы (Рисунок 10с), то есть корешки изогнуты вдоль своей продольной оси. Все корешки направлены вдоль поверхности личинки к переднему концу тела. В цитоплазме ресничных клеток встречается очень небольшое число митохондрий, шероховатый ЭПР, а также несколько аппаратов Гольджи. Связь между эпителиальными пластинками осуществляется за счет специализированных клеточных контактов двух типов (Рисунок 10с); на некоторых срезах видны довольно глубокие интердигитации между пластинками. Ближе к поверхности клеток между пластинками формируются десмосомоподобные контакты, глубже – изолирующие контакты. Аналогичная связь организована между задними пластинками и безресничной клеткой (Рисунок 10d). Безресничная клетка (протегумент) значительно крупнее эпителиальных пластинок, занимает не менее трети объема всего мирацидия (Рисунок 10а). Клетка содержит продолговатое ядро с выраженным ядрышком, по периферии ядра можно наблюдать гетерохроматин. В цитоплазме безресничной клетки активно идут процессы синтеза секрета. Об этом говорит наличие сильно развитого шероховатого ЭПР, аппаратов Гольджи и секреторных гранул разной степени зрелости. Зрелые гранулы сферической формы располагаются по периферии клетки в задней ее части. Также в цитоплазме имеются митохондрии и гранулы полисахарида. Эпителиальные пластинки наряду с безресничной клеткой подостланы выраженной на всем протяжении базальной пластинкой. К базальной пластинке посредством гемидесмосом крепятся мышечные клетки (Рисунок 10с). Мускулатура мирацидия P. affine представлена только кольцевыми элементами. Не менее чем девять клеток с неупорядоченным волокном, крепясь к базальной пластинке гемидесмосомами, окружают железу проникновения личинки. От мышечных клеток тянутся вытянутые отростки (Рисунок 12с), содержащие гранулы полисахарида и митохондрии. Такие отростки косо направлены к заднему концу личинки, к месту расположения тел нейронов (см. ниже).

Аппарат проникновения

Аппарат проникновения мирацидия P. affine (Рисунок10; Рисунок11) состоит из элементов двух типов: крупной железы проникновения и двух «кристаллических» клеток (Рисунок11). Железа проникновения занимает большую часть объема тела мирацидия (Рисунок 10а), как бы сдавливая, притесняя все остальные клетки. Эта клетка лишена ядра, вся ее цитоплазма равномерно заполнена секреторными гранулами и обильно представленными гранулами гликоген-подобного полисахарида. Гранулы секрета цилиндрической формы примерно 0,4х0,1 мкм в разрезе, одеты одной мембраной, секрет электронно-плотный гомогенный. Встречаются единичные гранулы, но в большей степени на срезах обнаруживаются гранулы, собранные в стопки по 5-10 гранул. По периферии железа проникновения армирована упорядоченным цитоскелетом из микротрубочек. В задней части клетки микротрубочки редки, ближе к переднему концу часто расположенные микротрубочки армируют короткий проток железы (рис 10а). Апикальный участок железы проникновения расширен и образует апикальную шапочку (Рисунок 11а). Здесь же, на переднем конце, можно наблюдать связь этого апикального расширения с эпителиальными пластинками первого ряда. Связь осуществляется за счет десмосомы. Апикальная шапочка состоит из электронно-плотного вещества и характеризуется ровной поверхностью.



Рисунок 11. Аппарат проникновения мирацидия *Parvatrema affine*. а – срез через передний конец мирацидия, стрелки указывают на десмосомы, связывающие кристаллическую железу с ее протоком, звездочкой отмечен кристалл; b – кристаллическая железа, звездочкой отмечен кристалл. Сокращения: аж – апикальная железа; кж – кристаллическая железа; м – кольцевые мышечные клетки; п – проток кристаллических желез; ш – шапочка апикальной железы; эп – эпителиальная пластинка. Масштаб: 2 мкм.

В передней трети тела мирацидия обнаруживаются две крупные (5,5х3 мкм)

«кристаллические» клетки (Рисунок 11). Цитоплазма каждой из них целиком заполнена единственной обширной секреторной гранулой эллиптической формы. Гранула одета одной мембраной, заполнена электронно-плотным содержимым.



Рисунок 12. Нервная система мирацидия *Parvatrema affine*. а – тела нейронов. Масштаб: 2 мкм; b – сенсорные окончания, стрелки указывают на кольцевые десмосомы, звездочками отмечена шапочка апикальной железы. Масштаб: 1 мкм; с – нервные отростки, стрелками отмечены отростки мышечных клеток, звездочкой отмечен нейромышечный контакт, нейросекреторные гранулы обведены в кружок. Масштаб: 1 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; м – кольцевые мышечные клетки; н – нейрон; но – нервный отросток; с – сенсорное окончание; эп – эпителиальная пластинка.

Среди содержимого гранулы в центральной ее части имеются один или два прямоугольных кристалла неизвестной природы. Эти кристаллы крупные (5,5х1,2мкм), формируют своеобразную ось гранулы (Рисунок 11b); хорошо видны даже на светооптическом уровне (Рисунок 10b), почему клетки и получили название кристаллических. Кристаллические клетки, безусловно являясь железистыми, снабжены протоком. Общий для двух клеток проток представлен отдельной клеткой-каналом.

Кристаллические клетки соединены с протоком с помощью десмосом (Рисунок 11а). Проток вплотную подходит к апикальному расширению железы проникновения.

Нервная система

Нервная система мирацидия *P. affine* состоит из двух мультиполярных нейронов (Рисунок 12а). Тела нейронов, содержащие плотные ядра с большим количеством гетерохроматина, располагаются в задней части тела в непосредственной близости от безресничной клетки. Тела содержат митохондрии, свободные рибосомы. От тел нейронов к переднему концу тянутся отростки, содержащие гранулы нейромедиатора. Отростки дифференцированы по размеру и типу нейромедиатора. Среди них можно выделить два более крупных (Рисунок 12с), содержащих овальные гранулы 0,1 мкм в длину. На срезе через такой отросток обнаруживается небольшое количество микротрубочек. На переднем конце мирацидия эти отростки формируют сенсорные окончания (Рисунок 12b), пронизывающие апикальную шапочку (см. ниже) железы проникновения. Сенсиллы классического для Neodermata строения: содержат ригидную ресничку, крепятся к апикальному расширению железы проникновения при помощи кольцевых десмосом. Остальные отростки более мелкие, содержат микровезикулы с нейромедиатором. Они сложным образом сплетены вблизи тел нейронов (Рисунок 12а). Точную геометрию расположения этих отростков установить не удалось.

<u>Выделительная система</u> у мирацидия *P. affine* отсутствует.



Рисунок 13. Генеративный материал мирацидия *Parvatrema affine*. а – срез, демонстрирующий положение недифференцированной клетки, в овал обведены секреторные гранулы протегумента; b – недифференцированная клетка, звездочкой отмечена ее цитоплазма. Сокращения: аж – апикальная железа; кж – кристаллическая железа; ндк – недифференцированная клетка; но – нервные отростки; пт – клетка протегумента; яндк – ядро недифференцированной клетки. Масштаб: 2 мкм.

Генеративный материал

Генеративный материал мирацидия *P. affine* представлен одной недифференцированной клеткой, расположенной в задней части тела личинки (Рисунок 13). Будучи как бы вдавленной в безресничную клетку, недифференцированная клетка отделена от основной клеточной массы мирацидия. Большую часть цитоплазмы занимает ядро, богатое гетерохроматином. Здесь же присутствуют несколько митохондрий и свободные рибосомы.

3.1.3 Мирацидий Steringophorus furciger (Fellodistomidae)

Светооптические наблюдения

Яйца *S. furciger* эллиптической формы (Рисунок 14), приблизительный размер яйца: 40x20 мкм. Скорлупка толстая, склеротизована. На переднем конце яйца расположен оперкулюм. В содержимом яйца можно различить желточную мембрану и ее ядра, видны вакуоли разных размеров. Сам мирацидий занимает в яйце примерно две трети пространства. Его приблизительные размеры 30x15 мкм. Тело мирацидия покрыто ресничками, в передней половине тела видна железа и ее проток (Рисунок 14b). При работе микровинтом отчетливо видна поверхностно расположенная спиральная структура (Рисунок 14а), повторяющая форму тела.



Рисунок 14. DIC-микрофотографии яйца *Steringophorus furciger*, содержащего мирацидия. Масштаб: 5 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; кр – крышечка; сг – спиральные гребни; яц – ядра цитона.

ΠМ ٢ſ НК аж ЭП КΜ ЦΓ ГΤ НДК

Рисунок 15. Схема-реконструкция мирацидия *Steringophorus furciger*. Сокращения: аж – апикальная железа, гг – гиподермальные гребни, гт – тело гиподермы, км – кольцевые мышечные клетки, нк – нервные клетки, ндк – недифференцированные клетки, пм – продольные мышечные клетки, цг – цитон гиподермы, эп – эпителиальные пластинки.

основанная

на

комбинации

оптических

И

Реконструкция мирацидия,

ультраструктурных данных приведена в Рисунке 15.

Ультраструктурные данные

<u>Покровы</u>

Покровы мирацидия *S. furciger* сложены пятью ресничными эпителиальными пластинками (Рисунок 16; Рисунок 17). Четыре из них формируют два поперечных ряда, покрывающих переднюю половину тела. Эти пластинки несут равномерно расположенные реснички стандартного строения (9x2+2). Основание каждой реснички окружено небольшой кольцевой складкой поверхностной мембраны (Рисунок 16а). Каждая ресничка закреплена в цитоплазме пластинки одним исчерченным корешком (Рисунок5с).



Рисунок 16. Покровы мирацидия Steringophorus furciger.a – тангентальный срез через покровы мирацидия, стрелка указывает на границу эпителиальной пластинки, звездочками отмечены кольцевые складки вокруг ресничек. Масштаб: 5 мкм; b – срез через место соприкосновения эпителиальных пластинок, черные стрелки указывают на десмосомы, связывающие пластинки с гиподермальным гребнем, красные стрелки указывают на контакты между пластинками, красной звездочкой отмечена базальная пластинка, черными – корешки ресничек. Масштаб: 1 мкм; с – задняя эпителиальная пластинка, красная стрелка указывают на тонкую заднюю часть пластинки, черные стрелки указывают на кольцевые мышечные клетки. Масштаб: 2 мкм. Сокращения: гг – гиподермальный гребень; гц – гиподермальный цитон; км – кольцевая мышечная клетка; р – реснички; ск – скорлупка яйца; эп – эпителиальная пластинка; я – ядро гиподермального цитона.

Пятая пластинка представлена чашевидной клеткой, покрывающей заднюю половину тела мирацидия (Рисунок 16с; Рисунок 17). Передняя часть этой клетки также несет реснички, но к заднему концу они редеют, и на задней половине пластинки реснички отсутствуют вовсе. Пластинка в этой области представлена очень тонким (~150нм) цитоплазматическим слоем, в котором отсутствуют какие-либо включения (Рисунок 16с). Все эпителиальные пластинки безъядерные, их цитоплазма содержит митохондрии и подобные гликогену частицы. В некоторых местах между пластинками видны плотные контакты («tight junctions») (Рисунок 16b).

Гиподерма

Гиподерма S. furciger представлена одной клеточной территорией, которую можно условно разделить на три зоны. Первая зона – это крупное «тело гиподермы», расположенное в задней части личинки под тонким слоем задней эпителиальной пластинки (Рисунок 17; Рисунок 18а). Цитоплазма в этой зоне несет подобные гликогену частицы, митохондрии и множество секреторных гранул. Гранулы эллиптической формы, содержат электронно-плотный материал с электронно-светлой везикулой. Вторая зона – цитон – лежит кпереди от клеточного тела гиподермы и связан с ним одним цитоплазматическим мостиком, армированным микротрубочками (Рисунок17, Рисунок 18с). Цитон занимает существенный объем тела мирацидия, достигая его середины. Цитон содержит два ядра, шероховатый эндоплазматический ретикулюм, аппараты Гольджи, зрелые и зреющие секреторные гранулы, множество подобных гликогену частиц (Рисунок 18а). Третья зона – это гиподермальные гребни. Гиподермальные гребни представлены множеством цитоплазматических выростов, отходящих от края клеточного тела гиподермы (Рисунок 17; Рисунок 18а; Рисунок 19b). Каждый гиподермальный гребень спирально закручен в пространстве между эпителиальными пластинками и мускулатурой мирацидия. Совокупность гиподермальных гребней формирует слой, подстилающий эпителиальные пластинки. Базальная пластинка заходит под этот слой (Рисунок 16b). Эпителиальные пластинки и гиподермальные гребни связаны септированными контактами только в тех местах, где гиподермальный гребень проходит под границами эпителиальных пластинок (Рисунок16b).



Рисунок 17. Схема покровов мирацидия *Steringophorus furciger*; желтый – эпителиальные пластинки; синий – гиподерма.

Аппарат проникновения

В передней половине тела мирацидия *S. furciger* расположена грушевидная апикальная железа (Рисунок 18а, Рисунок 19а). Это безъядерная клетка, содержащая множество секреторных гранул и похожих на гликоген частиц. Форма гранул не вполне ясна. На срезах через заднюю часть железы видны крупные круглые контуры гранул. Кпереди от них читаются круглые контуры меньшего диаметра и продолговатые извилистые контуры. Возможно, гранулы представляют собой продольно вытянутые закрученные структуры. Проток железы армирован микротрубочками (Рисунок 18а). Апикальная железа открывается на переднем конце мирацидия, формируя расширенный участок. От краев этого участка наружу вытягиваются цитоплазматические выросты (Рисунок 18b), лишенные каких-либо включений. Форма этих выростов до конца неясна, но они весьма длинны (~5) и формируют анастомозы.



Рисунок 18. Электронограммы срезов мирацидия *Steringophorus furciger*. а – продольный срез через всего мирацидия, черными стрелками отмечены гиподермальные гребни. Масштаб: 10 мкм; b – срез через передний конец мирацидия. Масштаб: 2 мкм; с – срез через цитоплазматический мостик, соединяющий цитон гиподермы с телом гиподермы, стрелки указывают на секреторные гранулы. Масштаб: 1 мкм; d – срез через недифференцированные клетки. Масштаб: 2 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; в – выросты апикальной железы; гг – гиподермальный гребень; км – кольцевые мышечные клетки; н – нейрон; ндк – недифференцированные клетки; паж – проток апикальной железы; ск – скорлупка яйца; тг – тело гиподермы; цг – цитон гиподермы; цм – цитоплазматический мостик; эп – эпителиальная пластинка.

Мускулатура

22 кольцевых и шесть продольных мышечных клеток расположены под гиподермальными гребнями мирацидия (Рисунок 18а, Рисунок 19а). Передний конец мирацидия лишен кольцевых элементов мускулатуры, но остальные участки содержат регулярно расположенные клетки. К заднему концу тела кольцевые мышечные клетки становятся тоньше. Продольные мышечные клетки тянутся через все тело мирацидия от переднего к заднему концу. Все мышечные клетки безъядерные, прикреплены к базальной пластинке при помощи гемидесмосом.

Нервная система

Нервная система мирацидия *S. furciger* представлена двумя мультиполярными нейронами (Рисунок 18а). Тела нейронов лежат между апикальной железой и цитоном гиподермы (Рисунок 18а). Детали расположения нервных отростков неясны. Они встречаются на срезах как через переднюю, так и через заднюю половину мирацидия. Была найдена лишь одна структура, напоминающая нервное окончание – это окончание одного из нервных отростков, связанное кольцевой десмосомой с гиподермальным гребнем в передней половине тела (Рисунок 19а). Проанализировав серию срезов через участок, содержащий эту структуру, мы не обнаружили свидетельств выхода «сенсиллы» на поверхность мирацидия.



Рисунок 19. Электронограммы срезов мирацидия *Steringophorus furciger*. а – поперечный срез через переднюю половину мирацидия, красная стрелка указывает на сенсорное окончание. Масштаб: 2 мкм. b – косой срез через задний конец мирацидия, черные стрелки указывают на гиподермальные гребни, красная стрелка – на тонкую часть задней эпителиальной пластинки. Масштаб: 3мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; гг – гиподермальные гребни; м – мышечная клетка; ндк – недифференцированная клетка; тг – тело гиподермы; цт – цитон гиподермы; эп – эпителиальная пластинка.

Выделительная система

Никаких следов выделительной системы в теле мирацидия *S. furciger* обнаружено не было.

Генеративный материал

Две недифференцированных клетки лежат в задней четверти мирацидия между цитоном гиподермы и клеточным телом гиподермы (Рисунок 18d, Рисунок 19b). Это

эллиптической формы клетки, лишенные каких-либо выраженных следов специализации. Каждая из клеток содержит ядро, занимающее большую часть цитоплазмы. В цитоплазме также имеются митохондрии и подобные гликогену частицы.



3.2 Мирацидии Hemiurata

Рисунок 20. Схема-реконструкция мирацидия *Derogenes varicus*. Сокращения: аж – апикальная железа; км – кольцевые мышечные клетки; м – цитоплазматический мостик (связывающий цт и т); мр – мышечная клеткаретрактор; н – нейрон; ндк – недифференцированная клетка; рэп – ребро эпителиальной пластинки; т – пластинка тегумента; тж – «темная» железа; цт – цитон тегумента; ш – шипы; эп – эпителиальная пластинка. *Схема выполнена таким образом, что ее левая и правая части являются продольными срезами через радиусы, обусловленные расположением эпителиальных пластинок (совмещение продольных латеральных проекций).

Светооптические наблюдения

Мирацидий *D. varicus* заключен в яйцо эллиптической формы с толстыми стенками. Стенки яйца плохо пропускают свет, что говорит о высокой степени задубленности белков, складывающих скорлупу. Мирацидий гантелевидной формы, размером порядка 15×10 мкм. Приведенные размерные характеристики в определенной степени условны, поскольку передний конец личинки может быть как сильно ввернут, так и полностью вывернут. Детали строения мирацидия на светооптическом уровне очень плохо видны. Удается определить только наличие шипов на переднем конце личинки и небольшое количество ресничек прямо за ними. При сдавливании яиц покровным стеклом личинки активизируются, вворачивая и выворачивая свой передний конец.

Схема-реконструкция мирацидия, созданная на основе комбинации светооптических и ультраструктурных данных представлена в Рисунке 20. Схема поверхности представлена в Рисунке 21.



Рисунок 21. Схема поверхности мирацидия Derogenes varicus.

Ультраструктурные данные

<u>Покровы</u>

Покровы мирацидия *D. varicus* представлены тегументом, к которому крепятся три эпителиальные пластинки (Рисунок 21), радиально-симметрично расположенные в передней трети тела личинки (Рисунок 22, Рисунок 24а). Пластинки треугольной формы

и характеризуются очень своеобразным строением: наряду с развитым ресничным аппаратом, занимающим задние участки поверхности клеток (Рисунок 22d), на их передних концах располагаются шипы (Рисунок 22a,b). Ультраструктура этих шипов в общих чертах схожа со структурой актин-армированных шипов тегумента, характерных для марит и их личинок (церкарий и метацеркарий). Материал, из которого состоит шип, зернистый, электронно-плотный. Выделяется тонкий более светлый гомогенный слой, расположенный под плазмалеммой, покрывающей шип (Рисунок 22b).



Рисунок 22. Электронограммы срезов мирацидия *Derogenes varicus* I. а – срез через переднюю половину мирацидия (черные стрелки указывают на шипы, белые – на кольцевые мышечные клетки). Масштаб: 2 мкм; b – срез через шипы мирацидия. Масштаб: 0,5 мкм; с – поперечный срез через переднюю треть эпителиальной пластинки (черная стрелка указывает на базальную пластинку, белые стрелки – на десмосомы). Масштаб: 0,5 мкм; d – косой срез через заднюю треть эпителиальной пластинки (черные стрелки указывают на реснички). Масштаб: 2 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; км – кольцевые мышечные клетки; мр – мышечная клетка-ретрактор хоботка; н – нервная клетка; ндк – недифференцированные клетки; паж – проток апикалной железы; р – ребро эпителиальной пластинки; т – пластинка тегумента; тж – «темная» железа; ш – шипы; эп – эпителиальная пластинка.

Каждая эпителиальная пластинка несет два продольных ряда шипов, расположенных по бокам от медиальной линии (Рисунок 21). В каждом ряду находится не менее десяти

направленных назад шипов, расположенных по размерному градиенту таким образом, что передние оказываются самыми длинными, а задние – самыми короткими. Медиальная зона клетки несет сильно скрученный «клубок» из двух мембран (Рисунок 22с,d) – ребро эпителиальной пластинки. Этот мембранный комплекс конической формы, его широкое основание лежит в задней трети эпителиальной пластинки; узкая вершина достигает передней трети. Удивительна природа этого ребра. Внешняя поверхность задней части пластинки пронизана множеством инвагинаций (Рисунок 22а). Поверхность полостей, сформированных этими инвагинациями, представлена сложной системой цитоплазматических выростов. Ближе к переднему концу эти выросты структурируются в единый клубок, являющийся совокупностью вложенных друг в друга стенок описанных инвагинаций. Реснички классического строения расположены на поверхности задней части эпителиальной пластинки продольными рядами (двумя группами по бокам от медиальной линии пластинки), немногочисленны (Рисунок 21). Основание каждой реснички окружено небольшой кольцевой складкой поверхностной мембраны пластинки (Рисунок 22d). От базального тельца реснички отходит сильно редуцированный единственный корешок. Электронно-плотная цитоплазма эпителиальных пластинок характеризуется наличием небольшого числа митохондрий, а также неправильной формы вакуолей. Края эпителиальных пластинок связаны с тегументом при помощи десмосом (Рисунок 22с). Под базальной мембраной участков клеток, не соприкасающихся с тегументом, можно наблюдать хорошо выраженную базальную пластинку (Рисунок 22с). Базальная пластинка также выражена и под тегументом. Как было отмечено выше, передний конец тела личинки способен вворачиваться, то есть являет собой интроверт. На срезах удалось наблюдать личинок как с ввернутым интровертом, так и с вывернутым. Тегумент личинки D. varicus характеризуется разной толщиной в разных участках тела. Он может быть выражен как узкая полоска, фактически лишенная цитоплазмы, так и достигать существенной толщины (1,5-2 мкм) (Рисунок 23а). В тех участках, где тегумент хорошо выражен, он представляет собой синцитиальную пластинку, богатую разнообразными включениями (Рисунок 22а). Здесь имеются крупные митохондрии, мощно развитый шероховатый эндоплазматический ретикулюм (ШЭПР), свободные рибосомы, гранулы полисахарида, а также множество вакуолей. Последние часто оказываются сгруппированными, что создает впечатление «пенистости» тегумента. Погруженная часть тегумента представлена единственным цитоном, занимающим около

56

половины объема мирацидия (Рисунок 23а). Узкий цитоплазматический мостик, расположенный в заднем участке тела личинки (Рисунок 23b), связывает синцитиальную пластинку с цитоном. Клеточное тело несет два активных ядра (Рисунок 23а), окруженных развитым ШЭПР. Цитоплазма цитона значительно отличается от таковой пластинки – он несет большое число сферических секреторных гранул разной степени зрелости.



Рисунок 23. Электронограммы срезов мирацидия *Derogenes varicus* II. а – продольный срез через цитон тегумента, масштаб: 1 мкм; b – срез через мостик, соединяющий цитон и пластинку тегумента (черная стрелка), масштаб: 1 мкм; с – срез через стенку тела, демонстрирующий отросток мышечной клетки (черная стрелка), масштаб: 2 мкм. Сокращения: км – кольцевые мышечные клетки, цт – цитон тегумента, я – ядра цитона тегумента, т – пластинка тегумента.

<u>Мускулатура</u>

Мускулатура мирацидия *D. varicus* представлена не менее чем восьмью кольцевыми клетками и двумя продольно ориентированными (Рисунок 22а). Кольцевые клетки содержат неупорядоченно расположенные миофиламенты и лежат под базальной пластинкой, с которой они связаны гемидесмосомами. Расположены эти мышечные клетки на равном расстоянии друг от друга. Среди всех колец можно выделить 4–6-е кольца – в зоне этих колец наблюдается слегка выраженная перетяжка у мирацидиев, зафиксированных в вывернутом состоянии. Продольная мускулатура представлена двумя мощными клетками, выполняющими функцию ретракторов «интроверта» (Рисунок 22а). Одним концом они крепятся к базальной пластинке у переднего конца. Сзади ретракторы соединены с базальной пластинкой двумя лопастями – в промежутках между 4-м и 5-м

кольцом мускулатуры и между 5-м и 6-м. Кольцевые мышечные клетки в некоторых местах формируют широкие отростки. В них можно наблюдать гранулы полисахарида и изредка попадающие на срез вакуоли. Как правило, такие отростки направлены к переднему концу тела (Рисунок 23с).



Рисунок 24. Электронограммы срезов мирацидия *Derogenes varicus* III. а – поперечный срез через ввернутый передний конец (белая стрелка указывает на сенсорное окончание), масштаб: 1 мкм; b – срез через «темную» железу (черная стрелка указывает на проток железы), масштаб: 1 мкм. Сокращения: км – кольцевые мышечные клетки; т – пластинка тегумента; тж – «темная» железа; эп – эпителиальная пластинка; ш – шипы.

Аппарат проникновения

Аппарат проникновения представлен двумя типами желез. Обширная двуядерная апикальная железа грушевидной формы занимает переднюю половину тела личинки (Рисунок 22а). В ней можно наблюдать мощно развитый белоксинтезирующий аппарат, представленный ШЭПР. В цитоплазме железы проникновения накоплены зрелые гранулы секрета. Гранулы сферической формы, равномерно заполнены электронносодержимым. Апекс железы связан с эпителиальными пластинками плотным десмосомами. Хорошо выражен проток железы, армированный цитоскелетом из микротрубочек. Железы второго типа представлены двумя «темными» клетками (Рисунок 24b). Темные железы расположены в передней половине тела, по бокам от железы Эти проникновения. клетки безъядерны, характеризуются электронно-плотной цитоплазмой, заполненной секреторными гранулами. Протоки темных желез тянутся к

переднему концу тела мирацидия, иногда примыкая к базальной пластинке. Точное место, где темные железы открываются на поверхности личинки, установить не удалось.

Нервная система

В теле мирацидия *D. varicus* удалось обнаружить единственную нервную клетку (Рисунок 22а), тело которой расположено в его передней трети. Это мультиполярный нейрон с гантелевидным ядром, богатым гетерохроматином. Точное расположение отростков установить не удалось. Однако, судя по всему, один отросток огибает проток железы проникновения, где, раздваиваясь, направляет ветви к переднему и заднему концам тела личинки. Также от тела нейрона отходят ещё два отростка, один из которых тянется назад, а другой – к переднему концу. Вероятно, последний формирует на переднем конце сенсиллу, которая хорошо видна на поперечном срезе через ввернутый интроверт. Сенсилла приурочена к тегументу (Рисунок 24а); клеточный контакт, связывающий сенсиллу с синцитиальной пластинкой, на срезы не попал. Цитоплазма всех элементов нервной системы, которые удалось наблюдать, характеризуется наличием микровезикул с неким нейромедиатором.

Выделительная система

Специализированная выделительная система у мирацидия D. varicus отсутствует.



Рисунок 25. Электронограммы срезов мирацидия *Derogenes varicus* IV. а – срез через задний конец, масштаб: 2 мкм, b – недифференцированная клетка, масштаб: 1 мкм. Сокращения: км – кольцевые мышечные клетки; ндк – недифференцированная клетка; т – пластинка тегумента; цт – цитон тегумента.

Генеративный материал

Генеративный материал представлен в теле личинки одной недифференцированной клеткой, расположенной в середине тела. Будучи «зажатой» между железой проникновения и цитоном тегумента, недифференцированная клетка оказывается слегка вдавленной в последний. Ядро недифференцированной клетки богато гетерохроматином, в цитоплазме лежит множество свободных рибосом (Рисунок 25).



3.2.2 Мирацидий Bunocotyle progenetica (Hemiuridae)

Рисунок 26. Мирацидий *Bunocotyle progenetica* – оптическое исследование. Масштаб: 10 мкм. Сокращения: ш – шипы, пг – продольный гребень.

Светооптические наблюдения

Яйцо *B. progenetica* эллиптической формы (Рисунок 26а). Крышечка на переднем конце слабо выражена. Приблизительные размеры яйца 30-35х10 мкм. Большую часть объема яйца занимает личинка, в задней его части располагаются ядра желточной мембраны и тельца неясной природы. Детали внутреннего строения личинки, находящейся в яйце, под световым микроскопом фактически не различимы, однако хорошо видны шипы на поверхности передней четверти тела мирацидия. Также видна продольная линия, тянущаяся вдоль всей поверхности личинки (Рисунок 26а). При наблюдении за вылупившейся личинкой шипы видны гораздо лучше: располагаясь в шахматном порядке, они покрывают почти все тело, причем шипы на переднем конце – самые длинные, а к заднему концу существенно уменьшаются (Рисунок 26b). В передней

части тела видна железистая клетка, также заметно довольно большое количество ядер, расположенных прямо под поверхностью личинки.

Реконструкция мирацидия *В. progenetica*, основанная на комбинации светооптических и ультраструктурных данных представлена в Рисунке 27; схема покровов – в Рисунке 28.



Рисунок 27. Мирацидий *Bunocotyle progenetica* – оригинальная схема-реконструкция, сделанная на основе опубликованной ранее схемы поверхности мирацидия (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). Сокращения: аж – апикальная железа; гц – гиподермальный цитон; км – кольцевые мышечные клетки; мр – мышца-ретрактор; нк – нервные клетки; ндк – недифференцированные клетки; пгг – поперечные гиподермальные гребни; эп – эпителиальные пластинки.

<u>Покровы</u>

Мирацидий B. progenetica несет три продольно расположенных эпителиальных пластинки, покрывающих все тело личинки (Рисунок 28). Это плоские безъядерные клетки с очень слабо развитой цитоплазмой, которая лишена каких-либо органелл. Эпителиальные пластинки несут шипы (Рисунок 28; рис 29 a,b,c), острия которых направлены к заднему концу. Шипы расположены поперечными рядами в шахматном порядке. Шипы, расположенные на переднем конце пластинки, крупные – достигают длины в 3-4 мкм, диаметр в основании: ~1 мкм. Крупный шип представлен цитоплазматическим выростом, все пространство которого заполнено полым кором электронно-плотной структурой, формирующей каркас шипа (Рисунок 29а,b). На продольном срезе через кор отчетливо видна его поперечная исчерченность, напоминающая таковую корешка реснички (Рисунок 29с). На поперечном срезе через шип хорошо видна подковообразная форма кора (Рисунок 30а). Поверхность шипов покрыта гликокаликсом (Рисунок 29b), представленным плотно расположенными спирально закрученными тяжами неизвестной природы. Шипы, расположенные в средней части тела, в целом сохраняют описанное выше строение, а вот шипы, на задней половине пластинки, представлены небольшими бугорками с электронно-плотным содержимым (Рисунок 30b).



Рисунок 28. Схема поверхности мирацидия *Bunocotyle progenetica* (модифицированная схема из монографии Галактионова и Добровольского (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003).

<u>Гиподерма</u>

Мирацидий *B. progenetica* несет три продольных гиподермальных гребня, тянущихся вдоль границ эпителиальных пластинок (Рисунок 29а). Гребни совсем небольшие, на поперечном срезе их ширина составляет около 100 нм. Располагаясь между соседствующими эпителиальными пластинками, гиподермальные гребни связывают их септированными контактами (Рисунок 30d). Над гребнями эпителиальные пластинки формируют небольшие выросты, которые плотно прилегают друг к другу (Рисунок 30d). Помимо продольных гребней мирацидий несет множество гиподермальных гребней, представленных поперечно расположенными кольцами (Рисунок 29a, b; Рисунок 30b). Находясь непосредственно под эпителиальными пластинками, поперечные гребни не формируют с ними специализированных клеточных контактов. Расположение этих гребней соответствует расположению рядов шипов на поверхности эпителиальных пластинок. Размер этих гребней соотносится с размером шипов: ближе к переднему концу - крупные кольца, ближе к заднему - мелкие. Цитоплазма поперечных гребней содержит каналы, складчатая внутренняя поверхность которых армирована электронно-плотным кортексом со множеством микровиллей (Рисунок 29а, b; Рисунок 30b). Под поперечными гребнями гиподермы отчетливо видна базальная пластинка. Все гиподермальные гребни являются целостной системой, единой клеточной территорией – связывает их крупный двуядерный цитон, занимающий большую часть объема задней половины мирацидия (Рисунок 30с). Связь с цитоном осуществляется посредством цитоплазматических мостиков (Рисунок 30d). В цитоне хорошо развит белоксинтезирующий аппарат: вокруг его ядер развит шероховатый ЭПР, имеются аппараты Гольджи (Рисунок 30с). Также в цитоплазме цитона присутствуют митохондрии и гликоген-подобные тельца.



Рисунок 29. Мирацидий *Bunocotyle progenetica* – ультраструктурные данные. а – срез через поверхность мирацидия, синяя стрелка указывает на продольный гиподермальный гребень, красная стрелка указывает на сенсорное окончание. Масштаб: 2 мкм; b – Косой срез через основание шипа. Зеленая стрелка указывает на спиральный гликокаликс. Масштаб: 1 мкм; с – продольный срез через основание шипа. Зеленая стрелка указывает на исчерченную структуру кора шипа. Масштаб: 0,2 мк; d – сенсорное окончание мирацидия. Зеленые стрелки указывают на дополнительные внешние микротрубочки, красная стрелка – на кольцевую десмосому. Масштаб: 0,2 мкм. Сокращения: кгг – кольцевой гиподермальный гребень; км – кольцевая мышечная клетка; ш – шип; эп – эпителиальная пластинка.

Мускулатура

Мышцы мирацидия *B. progenetica* представлены тремя типами клеток: кольцевые клетки, продольно ориентированные клетки и мышцы-ретракторы передней части мирацидия (Рисунок 29а; Рисунок 30а,b). По нашим подсчетам в теле личинки имеется около 20-ти кольцевых клеток. Они залегают чуть глубже поперечных гиподермальных гребней, перемежаясь с ними (Рисунок 30b). Посредством гемидесмосом они крепятся к базальной пластинке. Под плотным слоем кольцевых мышечных клеток, залегают три продольно ориентированных клетки и три клетки-ретрактора. И те, и другие крепятся одним концом к базальной пластинке на переднем конце личинки, продольные клетки тянутся до заднего конца тела, а ретракторы прикрепляются к стенке тела примерно

посередине личинки. Судя по всему, все мышечные клетки снабжены миоцитонами (Рисунок 30a), которые содержат уплощенные ядра (именно эти поверхностно расположенные ядра хорошо видны при оптическом наблюдении), митохондрии и гликоген-подобные частицы. Точное расположение миоцитонов определить не удалось.



Рисунок 30. Мирацидий *Bunocotyle progenetica* – ультраструктурные данные. а – продольный срез через переднюю половину тела мирацидия. Синяя стрелка указывает на продольную мышечную клетку, красная – на мышцу-ретрактор, черные – на кольцевые мышечные клетки. Масштаб: 5 мкм; b – покровы мирацидия. Красные стрелки указывают на кольцевые гиподермальные гребни, черные – на кольцевые мышечные клетки. Масштаб: 1 мкм; c – косой срез через заднюю половину тела мирацидия. Масштаб: 5 мкм; d – связь между цитоном и кольцевым гиподермальным гребнем. Красная стрелка указывает на цитоплазматический мостик, черная – на продольный гиподермальный гребень. Масштаб: 1 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; мц – миоцитон; н – нейрон; ш – шип; пм – продольная мышечная клетка; ягц – ядро цитона гиподермы; гц – гиподермальный цитон; яаж – ядро апикальной железы.

Аппарат проникновения

Бо́льшая часть объема передней половины мирацидия *B. progenetica* занята апикальной железой (Рисунок 30а). Цитоплазма железы содержит два ядра, шероховатый ЭПР, гликоген подобные тельца, митохондрии и секреторные гранулы (Рисунок 30а). Форма и размер гранул строго не детерминированы: встречаются и небольшие сферические гранулы, и крупные гранулы неправильной вытянутой формы; электронноплотное содержимое идентично во всех гранулах. Проток апикальной железы не несет микротрубочек, открывается на переднем конце мирацидия; в этом участке цитоплазма дезинтегрируется, приобретая губчатую структуру (Рисунок 31а).

Нервная система

Мирацидий *B. progenetica* несет три-четыре нервных клетки, тела которых располагаются между апикальной железой и цитоном гиподермы (Рисунок 27, 30с). Точное расположение отростков нейронов установить не удалось. В передней трети тела личинки обнаружено нервное окончание, связанное с одним из продольных гиподермальных гребней кольцевой десмосомой (Рисунок 29a,d). Эта сенсилла прикрыта краями эпителиальных пластинок и не выходит на поверхность тела личинки. Сенсилла несет девять дуплетов микротрубочек, лишена центральных ресничного типа, микротрубочек, но дополнительно армирована единичными микротрубочками, расположенными на небольшом расстоянии кнаружи от дуплетов (Рисунок 29d).



Рисунок 31. Мирацидий *Bunocotyle progenetica* – ультраструктурные данные. а – срез через передний конец мирацидия. Масштаб: 2 мкм; b – срез через задний конец мирацидия. Масштаб: 3 мкм. Сокращения: кгг – кольцевой гиподермальный гребень, км – кольцевая мышечная клетка, мр – мышцаретрактор, ндк – недифференцированная клетка, паж – проток апикальной железы, цт – цитон гиподермы.

Никаких следов наличия выделительной системы у мирацидия *B. progenetica* обнаружено не было.

Генеративный материал

Мирацидий *B. progenetica* несет группу из четырех-пяти недифференцированных клеток, расположенных в заднем конце тела, сзади от цитона гиподермы (Рисунок 31b). Цитоплазма этих клеток очень слабо развита, несет несколько митохондрий и гликогенподобное вещество. Бо́льшую часть этих клеток занимает ядро с сильно конденсированным хроматином.

3.2.3 Материнская спороциста B. progenetica

Светооптические наблюдения

Спустя сутки после скармливания яиц *B. progenetica* моллюску *Peringia ulvae* две материнских спороцисты были обнаружены в полости его предсердия (Рисунок 32а). Однодневные спороцисты очень небольшие – несколько больше мирацидиев, активно двигаются, сокращаясь до шарообразного состояния и сильно вытягиваясь в длину до 60-70 мкм. Так как наблюдение производилось через стенку сердца, никакие детали строения столь маленьких спороцист не были видны в ходе светооптического исследования.



Рисунок 32. Материнские спороцисты *Bunocotyle progenetica* – оптические наблюдения. а – сутки после заражения, b – 14 суток после заражения. Масштаб 30 мкм.

Ультраструктурные данные

В полости предсердия моллюска материнскую спороцисту массово окружают гемоциты разных типов: это и сферические клетки, заполненные рыхлым содержимым, и амебоидные клетки, отростки которых входят в непосредственный контакт с покровами спороцисты (Рисунок 33а; 34а). Гемолимфа содержит множество низкомолекулярных веществ, организованных в сферические гранулы (Рисунок 34b); концентрация этих веществ возрастает вблизи покровов спороцисты. Покровы однодневной спороцисты В. progenetica представлены полностью сформированной пластинкой тегумента (Рисунок 33d; Рисунок 34b). Тегумент очень тонкий, его толщина приблизительно равна 100-300 HM. Наружная цитоплазма тегумента пронизана множеством мелких каналов, открывающихся на его поверхности (Рисунок 34b). Поверхность же несет множество маленьких хаотично расположенных микровиллей, цитоплазматическая мембрана подстилается тонким слоем электронно-плотного вещества (Рисунок 34b). Цитон тегумента залегает в средней части спороцисты (Рисунок 33b,с), его положение соответствует положению в мирацидии, однако его размер успел увеличиться. Цитон попрежнему несет два ядра, которые на этом этапе очень активны: их хроматин деконденсирован, хорошо выражены ядрышки. Цитоплазма цитона также чрезвычайно активна: наблюдается обширная шероховатая эндоплазматическая сеть. распространяющаяся фактически на весь объем цитона, встречаются аппараты Гольджи, единичные липидные капли, вакуоли, в которых происходит или сборка, или разборка какого-то вещества; остальной объем цитона плотно забит митохондриями.



Рисунок 33. Однодневная материнская спороциста *Bunocotyle progenetica*. а – спороциста в полости предсердия. Масштаб: 10 мкм; b – косой срез через среднюю часть спороцисты; красная стрелка указывает на тегумент. Масштаб: 5 мкм; с – косой срез через заднюю половину спороцисты; черная стрелка указывает на ядрышко; красная стрелка указывает на тегумент. Масштаб: 3 мкм; d – срез через задний конец спороцисты; красные стрелки указывают на нервные отростки. Масштаб: 2 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; ге – гемоцит; де – дегенерация; мц – миоцитон; н – нейрон; ндк – недифференцированная клетка; п – полость предсердия; ст – стенка предсердия; сп – спороциста; т – тегумент; цт – цитон тегумента.

Мышцы материнской спороцисты *В. progenetica* существенно развиты по сравнению с мирацидием (Рисунок 34). Они по-прежнему представлены кольцевыми и продольными элементами, но число мышечных клеток к этому этапу развития значительно увеличилось. Особенно бросается в глаза явное увеличение числа

69

продольных мышечных клеток, которые формируют полноценный слой под кольцевой мускулатурой. Хорошо детектируются гемидесмосомы, с помощью которых мышечные клетки крепятся к базальной пластинке. Судя по всему, увеличилось и количество миоцитонов, которые встречаются буквально на каждом срезе. Миоцитоны несут уплощенные ядра и плотно прилегают ко внутренней поверхности кожно-мускульного мешка.

В передней части материнской спороцисты после метаморфоза сохранилась апикальная железа (Рисунок 33b; Рисунок 34a), которая столь же активна, как и цитон. Железа несет два активных ядра, развит белок-синтезирующий аппарат, в цитоплазме наблюдаются секреторные гранулы с электронно-плотным содержимым. Гранулы того же строения, что и в мирацидии – неправильной близкой к эллиптической форме. В передней части железа формирует проток, тянущийся к переднему концу спороцисты. К сожалению, место, где этот проток открывается на поверхности, на срез не попало.

В задней половине материнской спороцисты, за цитоном тегумента, расположена группа из 5-6 клеток (Рисунок 33с,d). Передние клетки из этой группы, судя по всему, нервные – в их цитоплазме отчетливо видны микросекреторные гранулы, напоминающие гранулы нейромедиатора. Точное расположение отростков этих клеток установить не удалось. На срезах через передний конец хорошо виден один крупный отросток, более мелкие отростки часто встречаются возле мышечных клеток, где они формируют нейромышечные контакты. Как минимум 3 клетки, расположенные сзади от нервных, мы трактуем как недифференцированные клетки (Рисунок 33с,d) – большую их часть занимает ядро с конденсированным хроматином, цитоплазма развита слабо. Признаков деления этих клеток обнаружено не было. Некоторые из клеток, находящихся поблизости от этой группы, дегенерируют (Рисунок 33с,).

Никаких признаков появления выделительной системы на этом этапе обнаружено не было.



Рисунок 34. Однодневная материнская спороциста *Bunocotyle progenetica*. а – срез через край спороцисты; красные стрелки указывают на кольцевые мышечные клетки, зеленые – на продольные. Масштаб: 3 мкм; b – поперечный срез через передний конец спороцисты; красная стрелка указывает на каналы, черные – на микровилли; в кружок обведено гранулярное содержимое гемолимфы моллюска. Масштаб: 1 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; ге – гемоциты; км – кольцевая мышечная клетка; п – полость предсердия; т – тегумент; паж – проток апикальной железы.

Светооптические наблюдения

Спустя 14 суток после скармливания яиц *B. progenetica* моллюскам *Peringia ulvae*, в одном из моллюсков была обнаружена материнская спороциста (Рисунок 32b). На этом этапе она по-прежнему находилась в полости предсердия. В отличие от однодневных спороцист, эта особь была окружена некоторого рода капсулой – светлой зоной, лишенной клеток. Двухнедельная спороциста существенно крупнее однодневной, в вытянутом состоянии достигает 120-140 микрометров в длину. В средней части спороцисты отчетливо видна пара крупных ядер с ядрышком, сзади от них – группа из нескольких более мелких ядер. Когда спороциста вытягивалась, эти ядра выстраивались в ряд. На переднем конце спороцисты видна расширенная область, отделенная от остального тела небольшой перетяжкой.

Ультраструктурные данные

К сожалению, задняя половина двухнедельной спороцисты была утрачена при изготовлении срезов, поэтому здесь приводятся фрагментарные данные о ее строении.

В отличие от однодневной спороцисты, которая была окружена гемоцитами, вокруг двухнедельной спороцисты сформировался слой, лишенный каких-либо клеток. Лишь в одном месте наблюдался выраженный контакт с тканью моллюска (Рисунок 35с). В пространстве вокруг спороцисты сконцентрировано множество низкомолекулярных веществ, представленных сферическими гранулами (Рисунок 35а).

Структура покровов двухнедельной спороцисты в точности соответствует таковой у однодневной спороцисты (Рисунок 35b). Под пластинкой тегумента полноценно развит слой мышечных клеток, представленный кольцевыми и продольными элементами. Попрежнему мышечные клетки несут активные миоцитоны (Рисунок 35а).

Общее строение «внутренностей» двухнедельной спороцисты отличается от такового однодневной спороцисты: существенно развилось межклеточное пространство, клетки лежат гораздо более рыхло (Рисунок 35а).

У двухнедельной спороцисты по-прежнему сохраняется двуядерная апикальная железа (Рисунок 35а), заполненная гранулами секрета неправильной формы. Продолжается активный синтез в этой железе: хроматин разобран, отчетливо видна сеть шероховатого ЭПР, в некоторых каналах которого видны формирующиеся гранулы секрета.

Судя по всему, у двухнедельной спороцисты сохраняется обширный двуядерный цитон (Рисунок 35с), ядра которого были отчетливо видны при светооптическом исследовании. В его цитоплазме наблюдаются мощно развитая сеть шероховатого ЭПР, аппараты Гольджи, митохондрии и весьма необычные включения (Рисунок 35с). Они представлены довольно крупными телами неправильной формы; содержимое этих тел включает несколько слоев плотно упакованных параллельно лежащих фибрилл неизвестной природы (фибриллы в разных слоях ориентированы по-разному).


Рисунок 35. Двухнедельная спороциста *Bunocotyle progenetica*. а – косой срез через переднюю половину спороцисты; красная стрелка указывает на тегумент, зеленая – на мышечные клетки; в кружок обведено гранулярное содержимое гемолимфы. Масштаб: 5 мкм; b – срез через покровы спороцисты; красной стрелкой отмечен контакт с тканью моллюска. Масштаб: 2 мкм; с – срез через цитон тегумента спороцисты; зелеными стрелками отмечены включения цитона, красной – контакт с тканью моллюска. Масштаб: 3 мкм. Сокращения: аж – апикальная железа; м – мышечная клетка; мк – межклеточное пространство; мц – миоцитон; ндк – недифференцированная клетка; п – полость предсердия; т – тегумент; тм – ткань моллюск; цт – цитон тегумента.

Помимо двуядерного цитона, «унаследованного» от мирацидия, к этому этапу у спороцисты появилось еще несколько цитонов. Они сильно меньше двуядерного, несут по одному ядру и располагаются непосредственно под слоем мышц, напоминая железы (Рисунок 35с). В цитоплазме этих цитонов также наблюдается синтез – развит шероховатый ЭПР. Синтезируются, судя по всему, секреторные гранулы, структура которых в целом соответствует гранулам из апикальной железы, но их содержимое характеризуется бо́льшей электронной плотностью.

Также в передней половине тела спороцисты было обнаружено несколько неактивных, ни с чем не связанных клеток, которые мы расцениваем как недиффернецированные (Рисунок 35с).

73

3.3 Мирацидий Opisthorchiata

Мирацидий Cryptocotyle lingua (Heterophyidae)



Светооптические наблюдения

Рисунок 36. Мирацидий *Cryptocotyle lingua* – оптическое исследование. Масштаб: 10 мкм. Сокращения: зц – задний цитон гиподермы, кр - крышечка, ндк – недифференцированная клетка, пжп – проток железы проникновения, жп – железа проникновения, пц – передний цитон.

Яйцо *C. lingua* эллиптической формы, крышечка на переднем конце отчетливо выражена (Рисунок 36). Приблизительные размеры 50х20 мкм. Мирацидий занимает бо́льшую часть объема яйца, оставляя около 1/5 части пространства свободной. В этом пространстве, в задней части яйца наблюдается пузырчатое вещество неясной природы. Отчетливо видны реснички, покрывающие все тело личинки. В теле хорошо различимы три железистых элемента: две расположенные одна за другой железистые клетки (Рисунок 36b), занимающие переднюю треть тела, и одна крупная клетка, занимающая фактически весь остальной объем тела. Последняя несет хорошо заметный проток, огибающий две «передних» железистых клетки (Рисунок 36а). В задней части мирацидия видна группа из нескольких плотно расположенных маленьких клеток (Рисунок 36b). Здесь же можно наблюдать работу одного протонефридия, мерцательное пламя которого направлено к переднему концу тела. При определенном ракурсе виден канал циртоцита, вдавленный в крупную железистую клетку.

Реконструкция мирацидия *C. lingua*, основанная на комбинации светооптических и ультраструктурных данных приведена в Рисунке 37.



Рисунок 37. Мирацидий *Cryptocotyle lingua* – схема-реконструкция. Сокращения: жп – железа проникновения; зц – задний цитон; км – кольцевые мышечные клетки; нк – нейрон; ндк – недифференцированные клетки; пц – передний цитон; пм – продольная мышечная клетка; пт – протонефридий; экп – экскреторная пора; эп – эпителиальная пластинка.

Ультраструктурные данные

<u>Покровы</u>

мирацидия С. lingua представлены четырьмя Покровы эпителиальными пластинками (Рисунок 37; Рисунок 38). Передняя половина тела личинки покрыта тремя продольно расположенными пластинками, задняя половина – одной конусовидной пластинкой. Пластинки несут длинные реснички классического (9x2+2) строения. Основание каждой реснички погружено в довольно глубокий карман (Рисунок 39е). От кинетосомы каждой реснички отходит единственный вертикальный исчерченный корешок. Все корешки согнуты таким образом, что на поперечном срезе представлены подковообразными структурами. Передние эпителиальные пластинки тонкие безъядерные, их цитоплазма несет митохондрии и гликоген-подобное вещество. Выделяется на фоне других задняя эпителиальная пластинка (Рисунок 38b) – это довольно крупная клетка с развитой цитоплазмой, которую заполняет гликоген-подобное вещество без каких-либо других включений и органелл. Под эпителиальными пластинками достаточно хорошо выражена базальная пластинка.

<u>Гиподерма</u>

Гиподерма мирацидия C. lingua представлена системой очень узких в поперечном сечении гребней (Рисунок 39е), связывающихся с эпителиальными пластинками в местах их соприкосновения, и двумя цитонами (Рисунок 38; Рисунок 39). Связь между пластинками и гребнями осуществляется при помощи септированных контактов (Рисунок 39е). Один цитон располагается на переднем конце личинки; здесь он связан с гребнями цитоплазматическими мостиками (Рисунок 37). Этот цитон формирует армированный микротрубочками проток (Рисунок 39b), который открывается на переднем конце личинки. аналогично гребням связываясь с эпителиальными пластинками септированными контактами. Цитоплазма этого цитона несет одно ядро, митохондрии, гликоген-подобное вещество и секреторные гранулы двух типов (Рисунок 38а). Один тип гранул представлен мелкими эллиптическими тельцами с гомогенным электронноплотным содержимым. Второй тип – более крупные неправильной формы гранулы, в содержимом которых можно наблюдать группы из нескольких темных телец. Второй цитон залегает сразу за первым (Рисунок 38а), достигает заднего края передней половины тела личинки. Он также несет одно ядро, митохондрии, гликоген-подобные

частицы и гранулы двух типов. Гранулы первого типа в точности такие же, как мелкие гранулы переднего цитона, а вот гранулы второго типа отличаются: они представлены сферическими телами с гомогенным электронно-плотным содержимым. Задний цитон формирует цитоплазматический мостик (Рисунок 38с) с гиподермальным гребнем, разделяющим передние пластинки и заднюю коническую пластинку.



Рисунок 38. Мирацидий *Cryptocotyle lingua* – ультраструктурные данные. а – косой срез через переднюю половину мирацидия; в красный кружок обведены секреторные гранулы переднего цитона гиподермы, в зеленый – заднего. Масштаб: 3 мкм; b – косой срез через заднюю половину тела мирацидия; черными стрелками отмечены недифференцированные клетки. Масштаб: 5мкм; с – поперечный срез на границе передней и задней половины мирацидия; черная стрелка указывает на цитоплазматический мостик, соединяющий задний цитон с гиподермальным гребнем. Масштаб: 3 мкм; d – поперечный срез через переднюю половину тела мирацидия; зеленая стрелка указывает на кольцевую мышечную клетку, красная – на продольную, синяя – на нервные отростки. Масштаб: 3 мкм. Сокращения: гг – гиподермальный гребень; жп – железа проникновения; зц – задний цитон; н – нейрон; пц – передний цитон; ппц – проток переднего цитона; пжп – проток железы проникновения; экп – экскреторная пора; эп – эпителиальная пластинка.

Мускулатура

Примерно 20 кольцевых мышечных клеток располагаются под базальной пластинкой мирацидия *C. lingua*, прикрепляясь к ней гемидесмосомами. Единственная продольно ориентированная мышечная клетка тянется от переднего конца личинки до заднего, залегая под кольцевыми клетками (Рисунок 38d). Мышечные клетки безъядерные, миоцитоны отсутствуют, в цитоплазме помимо неупорядоченно расположенных миофибрилл ничего обнаружено не было.

Аппарат проникновения

Основной элемент аппарата проникновения – крупная железистая клетка, занимающая бо́льшую часть внутреннего объема личинки (Рисунок 37, Рисунок 38). Тело этой клетки начинается примерно на уровне заднего конца передней трети личинки и простирается фактически до заднего конца тела. Цитоплазма этой железы заполнена секреторными гранулами. Содержимое гранул средней электронной плотности (серое), их форма близка к эллипсу. В центральной части клетки располагается ядро, шероховатый ЭПР присутствует, но развит очень слабо. У самых зрелых личинок мы наблюдали резорбцию ядерного аппарата и полное отсутствие ЭПР. От передней части этой железы отходит армированный микротрубочками проток, который тянется к переднему концу (Рисунок 39b). Достигая его, проток «встраивается» в проток цитона гиподермы, открываясь на поверхности тела личинки.



Рисунок 39. Мирацидий *Cryptocotyle lingua* – ультраструктурные данные. а – срез через передний конец мирацидия; красная стрелка указывает на сенсорное окончание. Масштаб: 1 мкм; b – косой срез, прошедший вблизи переднего конца мирацидия; зеленые стрелки указывают на кольцевые мышечные клетки. Масштаб: 1 мкм; с – срез через терминальные отделы протонефридия мирацидия; синяя стрелка указывает на клетку-канал. Масштаб: 2 мкм; d – поперечный срез через протонефридий мирацидия; черные стрелки указывают на отростки циртоцита, синяя стрелка – на десмосому, связывающую реснички. Масштаб: 1 мкм; е – срез через покровы мирацидия; черная стрелка указывает на гиподермальный гребень. Масштаб: 2 мкм. Сокращения: гг – гиподермальный гребень; зц – задний цитон гиподермы; жп – железа проникновения; кк – клетка-канал; км – кольцевая мышечная клетка; пжп – проток железы проникновения; ппц – проток переднего цитона; пц – передний цитон гиподермы; экп – экскреторная пора; эп – эпителиальная пластинка.

Нам удалось достоверно идентифицировать лишь одну нервную клетку, тело которой расположено в задней четверти тела мирацидия *C. lingua* (Рисунок 38b). Эта клетка формирует несколько отростков, точное расположение которых определить не удалось. Несколько отростков (или один извилистый) сопровождает проток железы проникновения, один из них достигает переднего конца тела, где формирует сенсиллу, встроенную в гиподермальный гребень вблизи протока гиподермального цитона (Рисунок 39а). Сенсилла ресничного типа, связана с гребнем кольцевой десмосомой. Еще несколько отростков (или один извилистый) тянутся вдоль протока железы проникновения. Некоторые отростки подходят к кольцевым мышечным клеткам.

Выделительная система

Выделительная система мирацидия *С. lingua* представлена единственным протонефридием, состоящим из циртоцита, клетки канала и экскреторной поры (Рисунок 39с,d). Циртоцит располагается в задней четверти личинки. Несет 4 реснички, поверхности которых связаны "десмосомами" (Рисунок 39d). Циртоцит связан с клеткойканалом десмосомами посредством нескольких отростков (Рисунок 39d). Клетка-канал характеризуется типичной для трематод морфологией: ее просвет формируют уплощенные отростки, края которых «сшиваются» септированными контактами. Протонефридий открывается экскреторной порой на поперечном гиподермальном гребне (Рисунок 39с, Рисунок 38с), связывающим передние эпителиальные пластинки с задней. Экскреторная пора пронизана небольшими канальцами, что придает ей вид губчатой структуры, и связана с гиподермальным гребнем септированным контактом.

Генеративный материал

В задней части мирацидия располагается группа из четырех недифференцированных клеток (Рисунок 38b). Из-за плотной упаковки эти клетки приобретают полигональную форму. Большую часть недифференцированных клеток занимает ядро. Цитоплазма очень слабо развита, в клетках встречаются единичные митохондрии.

3.4 «Мирацидий» Notocotylidae

3.4.1 «Мирацидий» Paramonostomum alveatum

Светооптические наблюдения

Яйцо *P. alveatum*, как это и свойственно представителям Notocotylidae, представлено эллиптическим телом и двумя длинными выростами – филаментами, отходящими от противоположных концов яйца. Тело яйца очень маленькое – всего лишь ~10х5 мкм (Рисунок 40). Оптический микроскоп фактически не позволяет разглядеть какие-либо детали содержимого яйца; единственное, что хорошо видно, это опреркулярный тяж – структура, огибающая тело личинки по продольному «меридиану» яйца. С одного из концов яйца, заметна поперечная линия, отделяющая изгиб оперкулярный тяжа. С противоположной стороны оперкулярный тяж разомкнут.



Рисунок 40. «Мирацидий» *Paramonostomum alveatum* – оптическое исследование. Масштаб: 10 мкм. Стрелки указывают на оперкулярный тяж.

Ультраструктурные данные

Яйцо *P. alveatum* содержит пару желточных клеток, желточную мембрану и «мирацидия» (Рисунок 41). Желточные клетки несут ядро, шероховатый ЭПР, митохондрии и вакуоли, заполненные гликоген-подобным веществом. Желточная мембрана подстилает скорлупку яйца. Будучи очень тонкой на «боковых» участках яйца,

желточная мембрана формирует расширение по его продольному «меридиану». Здесь в цитоплазме мембраны располагается U-образный оперкулярный тяж – включение, представленное комплексной структурой неизвестной природы (Рисунок 41a,c,d). В поперечном сечении тяж представлен круглым контуром, край которого обрамлен электронно-плотным материалом; под НИМ виден электронно-светлый слой, прерывающийся сердцевиной тяжа, диаметр которой разнится в зависимости от места, где прошел срез. Сердцевина на поперечном срезе представлена кольцом, стенка которого составлена из множества радиальных пучков электронно-плотного вещества. Ближе к месту изгиба оперкулярного тяжа, прямо под ним (вовнутрь) располагается ядро, окруженное шероховатым ЭПР (Рисунок 41d). Также в цитоплазме желточной мембраны можно наблюдать свободные рибосомы, гликоген-подобное вещество и митохондрии.

«Мирацидий» *P. alveatum* состоит из следующих клеточных элементов: покровной клетки и двух-трех клеток генеративного зачатка (Рисунок 41a,b). Личинка неправильной формы, несет на своей поверхности выросты и инвагинации (Рисунок 41a). Покровная клетка содержит два уплощенных ядра, в ее цитоплазме наблюдается множество свободных рибосом и митохондрий, часто встречаются аппараты Гольджи (Рисунок 41a). Ближе к поверхности покровной клетки располагается множество секреторных гранул. Гранулы сферические, содержат материал средней электронной плотности. Поверхность покровной клетки волнистая, несет большое число хаотично расположенных гребней, вершины которых армированы тонким слоем электронно-плотного вещества (Рисунок 41a).

Клетки генеративного зачатка устроены единообразно (Рисунок 41b). Бо́льшую часть клетки зачатка занимает ядро с сильно конденсированным хроматином. В цитоплазме имеется много свободных рибосом, митохондрии и маленькие электронноплотные гранулы (Рисунок 41a,b). Тела клеток генеративного зачатка плотно прижаты друг к другу, от каждого из них отходят отростки. Отростки оплетают клетки зачатка, а также отходят от них в стороны, погружаясь в толщу покровной клетки. В отростках обильно представлены электронно-плотные гранулы, который мы трактуем как «нуаж» (герминальные гранулы).

82



Рисунок 41. «Мирацидий» *Paramonostomum alveatum* – ультраструктурные данные. а – продольный срез через яйцо; красные стрелки указывают на тельца «нуаж». Масштаб: 3 мкм; b – генеративные клетки; красная стрелка указывает на «нуаж», черная стрелка указывает на отростки генеративных клеток. Масштаб: 2 мкм; с – срез через крышечку яйца. Масштаб: 2 мкм; d – поперечный срез через яйцо. Масштаб: 2 мкм. Сокращения: гк – генеративная клетка; жм – желточная мембрана; жк – желточная клетка; кр – крышечка; от – оперкулярный тяж; ск – скорлупка яйца; т – тегумент; яжм – ядро желточной мембраны; ят – ядро тегумента.

3.4.2 Материнская спороциста P. alveatum

Спустя две недели после скармливания моллюскам *Peringia ulvae* яиц *P. alveatum* в гемолимфе моллюска была обнаружена материнская спороциста, представленная полым тонкостенным мешком. При оптическом наблюдении за спороцистой, целостность ее стенки почти сразу была нарушена, и наружу высвободились три небольшие редии (Рисунок 42). Приблизительная длина редий: 50-70 мкм. Редии на этом этапе развития малоподвижны, но уже способны изменять форму своего тела, слегка сокращаясь и вытягиваясь. В передней части редии сформирована (или находится в процессе

формирования) глотка. Тело редии плотно забито клетками, никаких следов развития зародышевой полости и кишки на этом этапе не обнаружено.



Рисунок 42. Молодые материнские редии, развившиеся за 14 дней заражения Paramonostomum alveatum.

3.5 Обсуждение

Переход мирацидиев к пассивной стратегии заражения моллюсков – значимое событие в эволюции Digenea. Фактически, это одна из тенденций, которой независимо последовали представители разных ветвей эволюции дигенетических сосальщиков (Рисунок 43). Каждый случай перехода оставил глубокий след на морфофункциональной организации мирацидиев. Выражен этот след очень по-разному: некоторые пассивные личинки, хоть и крайне модифицированы по сравнению с активными, все-таки сохранили их основные признаки, другие же изменились «до неузнаваемости». Сравнение пассивных мирацидиев филогенетически далеких друг от друга дигеней позволяет утверждать, что процесс перехода к пассивной стратегии заражения ассоциирован с тремя тенденциями. Первая и, возможно, главная – миниатюризация. Вторая, во многом

связанная с первой, – редукция клеточных систем, потерявших функциональную нагрузку при «пассивном» заражении. Третья – модификация систем, которые попрежнему необходимы в новых условиях, но неэффективны в своем первоначальном виде. Очевидно, что проявляются эти тенденции весьма различно, и в строении каждого «пассивного» мирацидия отражается влияние комбинации этих тенденций.



Рисунок 43. Филодендрограмма Trematoda (по: Olson et al., 2003). Красным отмечены семейства, характеризующиеся «пассивным» мирацидием (по разным авторам)

Причины и преимущества миниатюризации мирацидиев могут быть логически объяснены. Зачастую взрослые эндопаразиты крупнее своих свободноживущих родственников (Dogiel, 1941). В отличие от этого, расселительные стадии паразитов во многих случаях оказываются подвержены тенденции уменьшения размеров тела. Очевидно, что чем меньше яйцо, тем меньше ресурсов тратится на его производство и тем продуктивнее паразит (Dogiel, 1941). Обильное производство трансмиссивного потомства

может играть решающее значение в эволюции паразитов. Миниатюризация мирацидиев, сопровождающаяся переходом к пассивной стратегии заражения (или наоборот), представляется очень эффективной тенденцией в эволюции дигеней. Шансы отдельного мирацидия заразить первого промежуточного хозяина существенно возрастают: попавшие в окружающую среду яйца с пассивными личинками накапливаются в среде, длительный период (до трех лет) сохраняя способность к инвазии. Судя по всему, выгодный процесс миниатюризации потребовал определенных затрат и жертв. В результате экстремального сокращая размеров тела, у «пассивных» мирацидиев сохранилиь только те элементы, которые необходимы и достаточны для успешного заражения.

Если сопоставить размеры «активных» и «пассивных» мирацидиев (Рисунок 44), то в глаза бросается отсутствие выраженного скачка между длиной личинок двух типов. Судя по всему, процесс миниатюризации начался еще у предковых активных форм. Среди описанных «активных» мирцидиев выделяются те, размер которых не многим больше самых крупных «пассивных» личинок. Такой мирацидий, например, характерен для представителей семейства Gorgoderidae (Goodchild, 1948). Было показано, что эти личинки вылупляются из яиц, активно плывут, но попадают в мантийную полость двустворчатого моллюска-хозяина пассивно – при втягивании моллюском воды через сифон. Наличие такой «промежуточной» стратегии заражения позволяет предполагать, что именно уменьшение размеров мирацидия являлось первым шагом к переходу к пассивной стратегии заражения. Вероятно, уменьшаясь до определенного размера, личинки просто теряют возможность эффективного поиска и проникновения в хозяина по схеме активной стратегии заражения.



Рисунок 44. Гистограмма, описывающая размерные характеристики мирацидиев с разной стратегией заражения (по разным авторам).

Строение "активных" мирацидиев сравнимо со строением других личинок Lophotrochozoa (трохофора, пилидий и т.п.), ювенильных турбеллярий и тем более с активными личинками других Neodermata (онкомирацидий, ликофора, корацидий). "Активные" мирацидии состоят из стандартного набора хорошо развитых клеточных систем (стенка тела, мышцы, нервы и т.д.). Этого нельзя сказать про исследованных нами «пассивных» мирацидиев - мы можем посчитать точное количество клеток, из которых состоят эти личинки. Разница между строением «пассивных» и «активных» мирацидиев не только количественная, но и качественная. Полость кишки как среда обитания безусловно сильно отличается от водной среды, а процесс проникновения в кишечный эпителий сильно отличается от перкутанного заражения. Судя по всему, некоторые системы оказались неэффективными в новых условиях и подверглись частичной или полной редукции либо же приобрели новый облик – специализировались для выполнения функции проникновения.

3.5.1 Мирацидии Bucephalata

Ни один из трех исследованных нами мирацидиев представителей группы Bucephalata (*Prosorhynchus squamatus* (Bucephalidae) (Smirnov, Dobrovolskij, 2019),

87

Parvatrema affinis (Gymnophallidae) (Smirnov, Dobrovolskij, 2021), Steringophorus furciger (Fellodistomidae) (Smirnov, Gonchar, 2022) не вылупляется в воде, поэтому мы предполагаем, что все они относятся к группе "пассивных" личинок. Однако, первым промежуточным хозяином для буцефалят служит двустворчатый моллюск, поэтому нельзя исключать, что некоторые мирацидии из этой группы могут использовать промежуточную стратегию заражения. Так как многие двустворчатые моллюски являются фильтраторами (например Mytilus edulis – первый промежуточный хозяин Pr. squamatus), теоретически, яйца дигеней могут случайно попадать в их мантийную полость и уже там, до проникновения в пищеварительную систему, возможен выход личинок из яиц и их внедрение в ткани моллюска. Похожая стратегия была описана для личинок Gorgoderidae (Goodchild, 1948), но в том случае уже вылупившийся мирацидий пассивно попадает в мантийную полость. Тем не менее, даже эта промежуточная стратегия выглядит гораздо более пассивной, чем настоящая активная, поскольку не включает поиска мирацидиями специфичного хозяина. Неоспоримым является тот факт, что структура каждой из трех исследованных личинок буцефалят, существенно отличается от структуры всех описанных «активных» форм. Мирацидии Pr. squamatus, P. affine и S. furciger сильно миниатюризованы, их клеточные системы существенно редуцированы и несут признаки специализации к альтернативному – пассивному пути заражения.



Рисунок 45. Сравнение пассивных личинок Bucephalata. a – *Steringophorus furciger*; b – *Parvatrema affinis*; с – *Prosorhynchus squamatus*. Желтый – эпителиальные пластинки; синий – гиподерма; оранжевый – мышечные клетки; зеленый – аппарат проникновения; фиолетовый – нервные клетки; красный — генеративный материал; серый – протонефридий.

Исходя из родства Bucephalidae, Fellodistomidae и Gymnophallidae, которое предполагает наиболее распространенная в настоящее время филогения Digenea (Olson et al., 2003), следует предположить, что переход к пассивной стратегии заражения мог произойти у их общего предка, до момента дивергенции этих семейств. Таким образом, сравнение мирацидиев из этих семейств Bucephalata может пролить свет на тенденции, движущие эволюцию этой стадии после единичного события смены стратегии заражения.

Мирацидии S. furciger, P. affine и Pr. squamatus (Рисунок 45)– чрезвычайно маленькие личинки. Самая крупная из них – феллодистомидная (30-35 мкм), самая мелкая – гимнофаллидная (20-25 мкм). Такие размеры сопоставимы с размерами некрупных одноклеточных существ (и даже с некоторыми органоидами: например, размер ядра *Amoeba proteus* составляет ~25 мкм (Mercer, 1959). Тем не менее, мирацидии Bucephalata, как и все представители Metazoa, состоят из нескольких специализированных клеточных систем. Три изученные личинки Bucephalata можно рассматривать как представителей одной размерной группы, противопоставляя их "активным" формам, которые значительно крупнее. Например, размер мирацидия *Fasciola hepatica* составляет 150 мкм (Mattes 1949), *Cyclocoelum microstomum* —340 мкм (Гинецинская, 1954).

Покровы мирацидиев Bucephalata

"Пассивным" мирацидиям не надо быть хорошими пловцами, поскольку они никогда не взаимодействуют с водной средой. Вылупившись из яиц, они оказываются в вязком содержимом кишечника моллюска. Судя по всему, действие ресничек в этих условиях неэффективно. Мы предполагаем, что возможность ресничной локомоции в данном случае ограничена очень низким числом Рейнольдса (физический показатель, характеризующий способность перемещения объекта определенного размера в жидкости определенной степени вязкости). Тенденция к редукции ресничного аппарата выражена в эволюции личинок Bucephalata. Мирацидий *Pr. squamatus* (Bucephalidae) обладает хорошо развитыми цилиарными эпителиальными пластинками, соединенными с гиподермальными гребнями. Покровы такого типа сопоставимы с тем, что наблюдается у «активных» форм (Wilson, 1969) (и у ряда других личинок Neodermata). Количество эпителиальных пластинок у *Pr. squamatus* уменьшено по сравнению с «активными» формами, поэтому мы можем говорить о явном сокращении эпителиальной формулы у мирацидиев Bucephalidae. «Активные» личинки чаще всего несут четыре (Тихомиров,

2000) или даже пять рядов пластинок (Albaret, Balbo, 1985), у личинки *Pr. squamatus* их всего два. Подобное сокращение мы видим и у мирацидиев Gymnophallidae и Fellodistomidae, но в обоих случаях задние концы полностью лишены ресничек. Более того, структура их покровов изменилась коренным образом, что позволяет говорить о возникновении новых типов покровов у мирацидиев Bucephalata.

Мы видим существенный шаг в реорганизации покровов в строении мирацидия S. furciger (Smirnov, Gonchar, 2022). Гиподерма этой личинки устроена совершенно нетипичным для мирацидиев образом. Те «активные» мирацидии, для которых были описаны покровы, несут гиподермальные гребни, расположение которых повторяет контуры эпителиальных пластинок (Pan, 1980). В процессе проникновения в ткани моллюска пластинки сбрасываются, и гребни «растекаются» по базальной пластинке (Southgate, 1970). Спирально закрученные гиподермальные гребни мирацидия S. furciger не повторяют никаких контуров, а формируют полноценный (хоть и прерывистый) слой, подостланный базальной пластинкой. Не исключено, что спиральная конструкция гиподермы придает упругость стенке тела личинки, что может оказаться важным в процессе внедрения в кишечный эпителий моллюска. Так или иначе, связь между пластинками и гребнями оказалась нарушена у феллодистомидной личинки. Вероятно, это привело к возникновению контактов между эпителиальными пластинками. Задняя эпителиальная пластинка, покрывающая гиподермальное тело личинки узким слоем цитоплазмы, фактически не несет функциональной нагрузки. Под этой тонкой оболочкой находится зона гиподермы, которая сама вполне могла бы принимать участие в формировании покровов личинки. Мы считаем, что такую конфигурацию покровных элементов можно считать предпосылкой к «тегументизации» мирацидия (Smirnov, Gonchar, 2022).

Структуру покровов мирацидия *P. affine* (Gymnophallidae) можно интерпретировать как результат развития тех же тенденций, эффект которых мы обнаружили у личинки *S. furciger*. В этом случае процесс пошел дальше, и связь между гребнями и эпителиальными пластинками была утрачена. Более того, сами гребни были утрачены, а эпителиальные пластинки стали организованы в настоящий эпителий с включенной в него клеткой протегумента. Мы рассматриваем это как следующий шаг процесса «тегументизации». Задняя эпителиальная пластинка мирацидия *S. furciger* по большей части лишена ресничек и не несет значимой функциональной нагрузки.

Вероятно, в ходе эволюции Gymnophallidae, задняя эпителиальная пластинка мирацидиев полностью редуцировалась, и гиподерма стала выполнять покровную функцию. Структура, положение и содержимое протегументной клетки, формирующей задний конец личинки *P. affine*, очень напоминает заднюю гиподермальную территорию личинки *S. furciger*.

Мускулатура мирацидиев Bucephalata

Мышцы мирацидиев служат для двух процессов: локомоции и проникновения. "Активные" мирацидии обладают двумя слоями мышц стенки тела: наружным кольцевым и внутренним продольным (Wilson, 1970; Pan, 1980; Collins et al., 2011). Сокращение мышц стенки тела у «активных» мирацидиев позволяет им менять направление плавания. Обычно мышцы концентрируются на переднем конце «активных» мирацидиев, образуя теребраториум, — структуру, которая принимает большое участие в процессе проникновения (Семенов, 1991).

Способность пассивных мирацидиев Bucephalata использовать мышечную локомоцию весьма сомнительна. Мы отмечаем выраженную тенденцию к редукции продольных мышечных элементов у мирацидиев этой группы. Мы обнаружили шесть продольных мышечных клеток у феллодистомидного мирацидия, только одну у буцефалоидной личинки и ни одной у гимнофаллоидной. Если наше предположение о неприменимости ресничной локомоции в вязком содержимом кишечника верно, то можно ожидать, что пассивные мирацидии активно используют мышцы для передвижения. Однако, тенденция к редукции одного слоя мышц в мирацидиях Bucephalata ставит под вопрос и такой способ локомоции, поскольку мышечная локомоция обычно основана на противодействии антагонистов – разнонаправленных элементов мускулатуры (Schmidt-Rhaesa, 2007).

Три исследованные личинки Bucephalata (Рисунок 44) несут мышечные клетки, расположенные равномерно вдоль тела, без концентрации на переднем конце. Таким образом, специализации мышц для процесса проникновения не обнаружено, можно констатировать редукцию теребраториума. Единственное исключение – протрактор стилета в мирацидии *Pr. squamatus* – мышечная клетка, которая явно специализирована для проникновения. Нами (Smirnov, Dobrovolskij, 2021) была выдвинута идея, что кольцевые мышцы гимнофаллоидного мирацидия могут использоваться для

выдавливания содержимого апикальной железы. Ранее высказывалось предположение о том, что и «активные» формы могут «нагнетать» секрет за счет мышечных сокращений (Семенов, 1991). Скорее всего, все личинки Bucephalata используют мышцы в процессе проникновения, но очевидно, что этот процесс существенно отличается от того, что происходит при внедрении «активных» мирацидиев.

Итак, мышечная система у мирацидиев Bucephalata, несомненно, редуцирована и модифицирована по сравнению с «активными» формами. Однако точные функции мышц у этих «пассивных» мирацидиев совершенно неясны; только наблюдение за вылупившимися личинками может пролить свет на природу этих модификаций.

Нервная система мирацидиев Bucephalata

Нервная система значительно теряет свою значимость после перехода мирацидиев к пассивной стратегии заражения. Поиск хозяина – очень «нервный» процесс: центральный ганглий, нервные стволы и различные сенсорные структуры контролируют сложное поведение «активных» мирацидиев (Collins et al., 2011). Когда мирацидии избавляются от необходимости поиска, они приобретают огромный потенциал для редукции нервной системы. Реконструированные нами мирацидии Висерhalata демонстрируют схожий уровень редукции нервной системы. Для личинок *Pr. squamatus*, *P. affinis* и *S. furciger* оказалось характерным наличие лишь двух нейронов (Рисунок 44).

Не только количество, но и расположение тел нейронов между гиподермальным цитоном/протегументом и апикальной железой у этих личинок идентично. Возможно, эти особенности организации были бы хорошим кандидатом в синапоморфные признаки для Bucephalata. Конфигурация нейронных отростков, по-видимому, несколько различается в мирацидиях Bucephalata. В мирацидии *Pr. squamatus* мы обнаружили ассоциацию между одним из нейронов с мышцей-протрактором стилета, при этом второй нейрон явно в такую ассоциацию не вступает. В отличие от этого, мирацидии Fellodistomidae и Gymnophallidae обладают «симметричной» нервной системой: никаких различий между двумя нейронами этих личинок обнаружено не было.

Сравнивая сенсорные структуры трех личинок, можно обнаружить сходство между мирацидиями *Pr. squamatus* и *P. affinis*. Обе личинки обладают цилиарными рецепторами, закрепленными кольцевыми десмосомами в шапочке апикальной железы. Известно, что "активные" личинки несут рецепторы на своих гиподермальных гребнях (Pan, 1980,

92

Тихомиров 2000), в большей степени располагаясь на теребраториуме. Расположение рецепторов на поверхности железы является «ноу-хау», и причины появления такого новшества не вполне объяснимы. Как уже упоминалось выше, у мирацидия *P. affinis* полностью редуцированы гиподермальные гребни, а у *Pr. squamatus* отсутствует какаялибо гиподермальная территория, открывающаяся на поверхности личинки. Судя по всему, в обоих случаях шапочка железы оказалась единственным местом, где рецепторы «смогли разместиться».

Поскольку рецепторы связаны с апикальной железой, их реакция, скорее всего, приводит к ее активации. Мы полагаем, что основными задачами этих рецепторов является детекция какого-то химического или механического сигнала, исходящего от эпителия кишечника моллюска, и передача этого сигнала к неким эффекторам, запускающим процесс проникновения. В случае с мирацидием *Pr. squamatus* эта реакция безусловно сопровождается выбросом стилета (части апикальной железы), который, вероятно, пронзает эпителий кишечника. У мирацидия *P. affinis* аналогичные стимулы могли бы привести к выдавливанию содержимого апикальной железы (Smirnov, Dobrovolskij, 2021).

В этом контексте неожиданным оказалось отсутствие сенсорных окончаний на поверхности мирацидия *S. furciger* (Fellodistomidae). Единственный обнаруженный нами рецептор встроен в гиподерму – такое расположение, безусловно, соответствует предковому состоянию, наблюдаемому у «активных» форм. Однако неизвестно, может ли сенсорное окончание, находясь под эпителиальными пластинками, что-либо ощущать. Сомнительно, что цитоплазматические выросты апикальной железы на переднем конце мирацидия *S. furciger* могут служить для сенсорных целей. Вопрос о том, как инициируется процесс проникновения этого мирацидия остается открытым.

Сравнивая организацию нервной системы у трех мирацидиев Bucephalata, мы обнаружили сходство между Fellodistomidae и Gymnophallidae («симметричная» функциональная нагрузка на нейроны) и между Bucephalidae и Gymnophallidae (наличие сенсорных окончаний на шапочке апикальной железы). Общей чертой является схожий уровень редукции. Неизвестно, пришли ли эти личинки к одному и тому же результату единым эволюционным путем или здесь мы имеем дело с конвергентно возникшими сходствами.

Выделительная система мирацидиев Bucephalata

Все исследованные «активные» мирацидии несут пару протонефридиев, которые развиты не так сильно, как у других стадий жизненного цикла (Семенов, 1991). Даже самые крупные экскреторные системы "активных" мирацидиев содержат четыре циртоцита (Семенов, 1991), и в некотором смысле эти системы уже редуцированы. «Пассивные» мирацидии Висерhalata явно склонны к полной редукции экскреторной системы. Среди изученных личинок только мирацидий *Pr. squamatus* обладает одним протонефридием. Полное отсутствие выделительной системы у представителей Gymnophalloidea указывает на ее ненужность после перехода к пассивной стратегии заражения мирацидиями Висерhalata. Неизвестно, нуждаются ли мирацидии, проводящие бо́льшую часть своей жизни в изоляции от внешней среды, в регуляции осмотического давления, должны ли они избавляться от некоторых отходов жизнедеятельности и могут ли они удалять их альтернативно. Ясно, что после заражения и метаморфоза, спороцисты Висерhalata должны строить свои выделительные системы *de novo*.

Модификация аппарата проникновения мирацидиев Bucephalata

«Активные» мирацидии обладают несколькими структурами, которые служат для проникновения. Центральной из них является теребраториум – расположенный на переднем конце подвижный хоботок, который инициирует проникновение, соединяясь с покровами моллюска. Апикальная железа и несколько вспомогательных желез открываются на поверхности теребраториума (Wilson, 1970; Pan, 1980; Тихомиров, 1983); секрет этих желез, вероятно, оказывает протеолитическое воздействие на покровы (Семенов, 1991). В некоторых исследованиях (Тихомиров, 1983) показано, что теребраториум является частью гиподермальной системы мирацидия.

На переднем конце мирацидия Bucephalata не было обнаружено никаких поверхностных гиподермальных структур. Мышцы, как уже отмечалось, здесь не концентрируются. Таким образом, мы фиксируем полную редукцию теребраториума. Однако все три изученных нами представителя сохранили апикальную железу. Существенным новшеством является соединение дистальной части железы с эпителиальными пластинками – единственно возможная конфигурация после редукции теребраториума. Хотя общие черты организации апикальной железы сходны у изученных мирацидиев Bucephalata, детали указывают на различия.

Наиболее заметным является наличие стилета у мирацидия Bucephalidae. В отличие от церкариального стилета, который предположительно появился единожды у предка Xiphidiata (Cribb et al., 2003; Olson et al, 2003), мирацидии, судя по всему, приобретали его несколько раз независимо. Стилет был описан у мирацидиев семейств Encyclometridae (Гинецинская, 1968), Sanguinicolidae (McMichael-Phillips et al., 1992) Bucephalidae (Smirnov, Dobrovolskij, 2019) и Brachylaimidae (Allison, 1943), которые не являются близкородственными (Brooks et al., 1985; Olson et al., 2003). Заявленное наличие стилета брахилемидного мирацидия (Allison, 1943), не было доказано в недавнем ультраструктурном исследовании (Swiderski et al., 2020), и не может быть использовано как аргумент, подтверждающий родство с Bucephalidae. Стилет мирацидия Bucephalidae может рассматриваться как аберрантный признак, отличающий эту личинку от других мирацидиев Bucephalata, у которых стилет отсутствует. Однако, оценивая происхождение стилета у буцефалид, можно заметить морфологическую связь между личинками Gymnophallidae и Bucephalidae. Эти мирацидии обладают похожей электронно-плотной шапочкой апикальной железы. Стилет *Pr.squamatus* как раз является продолжением этой структуры (Smirnov, Dobrovolskij, 2019). В отличие от этого, мирацидий S. furciger не имеет электронно-плотного колпачка, стоя в стороне от Bucephalidae и Gymnophallidae.

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

Генеративный материал мирацидиев Bucephalata

Разнообразие расположения зародышевого материала в мирацидиях представляет собой пример гетерохронии у Digenea (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). «Активные» мирацидии некоторых дигеней содержат полностью сформированную редию или дочернюю спороцисту, в других зародышевый материал находится в стадии развития или даже только в начале развития. Мирацидии Bucephalata обладают наиболее неразвитой

формой зародышевого материала – недифференцированными клетками. Очевидно, что более развитый зародышевый материал требовал бы существенно больше места. В чрезвычайно миниатюрных мирацидиях Bucephalata пространство для развития дочернего поколения, по-видимому, в дефиците.

Мы не видим существенных различий между структурой недифференцированных клеток в трех исследованных мирацидиях. Их положение также примерно одинаково. Единственная вариация – это количество таких клеток. Феллодистомидная и буцефалидная личинки обладают двумя недифференцированными клетками, а гимнофаллидная личинка – одной. Мы не можем дать объяснение этому различию, поскольку судьба этих клеток неясна. Очевиден тот факт, что пассивные мирацидии Висерhalata склонны сдерживать развитие зародышевого материала. Гимнофаллидная личинка пошла дальше других в этом направлении.

3.5.2 Мирацидии Hemiurata

Покровы мирацидиев Hemiurata

Исследованные нами личинки Hemiurata (*Derogenes varicus* и *Bunocotyle progenetica*) несут на своей поверхности шипы. В целом шипы и подобные им структуры характерны для многих представителей Neodermata, и, как правило, они располагаются на поверхности тегумента. Мирацидии гемиурат оказались уникальными на фоне этого правила – нами показано, что шипы приурочены к эпителиальным пластинкам (Смирнов, Крупенко, 2023). Такое расположение, хоть и необычно, но довольно понятно. В большинстве случаев Neodermata используют шипы для прикрепления к какой-то поверхности или опоры при перемещении по ней. Очевидно, что функция шипов у гемиуридных мирацидиев другая: будучи наиболее развиты на переднем конце, шипы, как мы предполагаем, служат для процесса проникновения в кишечный эпителий моллюска. В таком случае после проникновения эти шипы оказываются совершенно ненужными и сбрасываются вместе с эпителиальными пластинками.

Группа Hemiurata, безусловно, является одним из крупнейших таксонов Digenea, судя по всему, монофилетическим (Brooks et al., 1985; Olson et al., 2003). Довольно многочисленные светооптические описания гемиуридных мирацидиев показывают широкое разнообразие вариантов организации их покровов (Hussey, 1945; Self et al., 1963;

Schell, 1975; Madhavi, 1978; Matthews, Matthews, 1991). В подавляющем большинстве этих описаний говорится о наличии шипов на поверхности (Anderson, Anderson, 1963; Self et al., 1963; Madhavi, 1978). Сравнение имеющихся данных по строению покровов мирацидиев Hemiurata позволяет говорить о том, что появление шипов на эпителиальных пластинках и дальнейшие преобразования, ведущие к «оптимизации» их работы, сыграли существенную роль в эволюции «пассивных» личинок этой группы.

Наблюдаемые нами тенденции в эволюции покровов гемиуридных мирацидиев полностью поддерживают наше предположение о несоответствии ресничного способа локомоции условиям вязкого содержимого кишки моллюска (Smirnov, Gonchar, 2022: Смирнов, Крупенко, 2023).

Описанный Шеллом (Schell, 1975) мирацидий Lecithaster salmonis несет развитый ресничный покров – признак, который мы считаем анцестральным для гемиуридных личинок, поскольку он соответствует строению покровов «активных» форм. Дальнейшие эволюционные преобразования покровов связаны с появлением шипов на переднем Полученные нами данные проясняют происхождение шипов. Так как конце. составляющая основу шипа структура в точности соответствует структуре исчерченного корешка, мы предполагаем, что шипы возникли на основе ресничного аппарата. Первые этапы замещения ресничек шипами мы видим в строении покровов мирацидия Genarchopsis goppo (Madhavi, 1978), который по-прежнему несет ресничный покров, но его передний конец приобретает вооружение из шипов. Следующими в этом морфологическом ряду мы ставим тех личинок, у которых происходит сокращение ресничного аппарата и «тегументизация» покровов. В эту категорию попадает довольно много мирацидиев, устройство покровов которых даже называют типичным для гемиурат (Cribb et al., 2003). Типичным представителем таких личинок является исследованный нами мирацидий Derogenes varicus (Смирнов, Крупенко, 2023). Его покровы по большей части представлены тегументом. На переднем конце личинки располагаются три эпителиальные пластинки, несущие и вооружение из шипов, и реснички. Дальнейшие преобразования связаны с полной редукцией ресничек на поверхности эпителиальных пластинок. Лишенные ресничек покровы описаны для мирацидиев Azygiidae (Schauinsland, 1883; Looss, 1894; Hussey, 1945; Stunkard, 1956; Wootton, 1957) и Didimozoidae (Baylis, 1938, Self et al., 1963). Судя по схемам, эти личинки также несут на своей поверхности небольшие пластинки, вооруженные шипами. Любопытной кажется организация покровов исследованного нами мирацидия *B. progenetica*. Судя по всему, эти личинки не пошли по пути «тегументизации» покровов. Их тело целиком покрыто тремя крупными эпителиальными пластинками. Это можно объяснить тем, что пластинки оказываются ненужными в том случае, если несут реснички, а вот пластинки, покрытые шипами, могут оказаться весьма полезными в кишке моллюска. Стенка тела мирацидия *B. progenetica* мощно армирована и прочными шипами, и поддерживающими эти шипы плотными поперечными гиподермальными гребнями. Вероятно, такая конструкция позволяет мирацидию *B. progenetica* эффективно перемещаться в слизистом содержимом кишки моллюска.

Исключением из предлагаемого нами морфологического ряда следует считать мирацидия *Lecitochirium furcolabiatum* (Matthews, Matthews, 1991). Авторы описали личинку, покровы которой по большей части представлены тегументом, а небольшие эпителиальные пластинки, расположенные на переднем конце, не несут шипов, но несут реснички – такая организация кажется необычной на фоне остальных гемиурат. Если описание Мэттьюсов корректно, то отсутствию шипов у личинки *L. furcolabiatum* можно найти лишь два объяснения: либо эти личинки по какой-то причине не «открыли для себя» шипов, либо они утратили их вторично. Странным кажется и количество эпителиальных пластинок: в отличие от большинства личинок Hemiurata, которые характеризуются наличием трех пластинок, авторы (Matthews, Matthews, 1991) пишут о четырех у мирацидия *L. furcolabiatum*. Учитывая неуверенность, с которой об этом пишут авторы, не исключено, что данное описание содержит некоторые неточности.

Мускулатура мирацидиев Hemiurata

Детали организации мускулатуры существенно различаются у исследованных нами личинок. Мирацидий *B. progenetica* несет множество кольцевых мышечных клеток, формирующих полноценный слой, развита у него и продольная мускулатура. Судя по всему, все клетки несут миоцитоны. Такая организация мускулатуры очень похожа на то, что наблюдается у «активных» форм (Pan, 1980). Мы полагаем, что высокая степень развития мышечных элементов позволяет мирацидию *B. progenetica* эффективно перемещаться в кишечнике моллюска. Наши наблюдения за поведением личинки в мазке кишечного содержимого подтверждают это предположение. Продольные мышечные

клетки дифференцированы на локомоторные и мышцы-ретракторы переднего конца. Очевидно, что последние играют важную роль в процессе проникновения (см. ниже).

Мускулатура мирацидия *D. varicus* редуцирована по сравнению с *B. progenetica*. Количество кольцевых элементов существенно меньше, а продольная мускулатура представлена лишь мышцами-ретракторами. Структуры, напоминающие миоцитоны выражены, но ядра в них отсутствуют. Вероятно, мирацидий *D. varicus* способен перемещаться в кишке моллюска только вворачивая и выворачивая свой передний конец (Смирнов, Крупенко, 2023). Не исключено, что мускулатура вообще используется этой личинкой исключительно при проникновении в кишечный эпителий, а достижение места внедрения осуществляется пассивно при перемещении мирацидия с токами кишечного химуса.

Аппарат проникновения мирацидиев Hemiurata

Из сказанного выше понятно, что важным элементом аппарата проникновения мирацидиев Нетіигаta стали шипы на поверхности эпителиальных пластинок. Вворачивая свой передний конец, личинки направляют свои самые крупные шипы остриями к кишечному эпителию моллюска. Резкое сокращение кольцевой мускулатуры должно приводить к выворачиванию переднего конца, прокалыванию шипами эпителия кишки и заякориванию в нем переднего конца мирацидия. Судя по строению исследованных нами личинок, залогом успеха такого движения является наличие поддерживающих шипы прочных структур. Прочность эпителиальных пластинок мирацидия *D. varicus* обеспечивается особой структурой – «клубком», который формирует основу продольного ребра жесткости клетки (Смирнов, Крупенко, 2023). У мирацидия *B. progenetica* шипы укрепляются скрученными структурами, заложенными в кольцевых гребнях гиподермы.

По сути, передний конец мирацидиев Нетіигаtа является «интровертом», и напрашивается его сравнение с вворачиваемым теребраториумом «активных» форм. Теребраториум — это «самостоятельная» структура, снабженная собственной мускулатурой (Collins et al., 2011), его границы заканчиваются там, где начинаются первые эпителиальные пластинки. У гемиуратных личинок передний конец вворачивается вместе с вооруженными эпителиальными пластинками, поэтому проводить прямую параллель между этими структурами было бы некорректно. Тем не

менее, не исключено, что мышцы-ретракторы переднего конца личинок Hemiurata были сформированы на основе ретракторов теребраториума.

Оба исследованных нами мирацидия Hemiurata содержат крупные двуядерные апикальные железы, занимающие почти половину внутреннего объема тела в обоих случаях. Логично было бы предположить, что секрет этих желез используется мирацидиями при проникновении, но сохранение этой железы у материнской спороцисты *В. progenetica* (см. ниже) ставит под вопрос пенетрационную функцию апикальной железы у личинок гемиурат. Возможно, секрет этой железы обладает литическим свойством и используется мирацидиями гемиурат как в процессе проникновения, так и после него (при миграции в тканях моллюска).

Нервная система мирацидиев Hemiurata

Нервная система исследованных нами мирацидиев Hemiurata, аналогично тому, что оказалось характерным и для других «пассивных» личинок, существенно редуцирована. И у мирацидия D. varicus, и у личинки B. progenetica нервная система представлена отдельными мультиполярными клетками, не формирующими ни ганглиев, ни стволов. Число нейронов больше у мирацидия *B. progenetica* – вероятно, это связано с тем, что эта личинка значительно крупнее таковой D. varicus. Она состоит из большего числа элементов мускулатуры, что требует наличия более сложной нервной системы. Вполне возможно, что не столь сильно редуцированная нервная система мирацидия *B. progenetica* позволяет ему осуществлять мышечную локомоцию, находясь в кишечнике моллюска. У личинки D. varicus нам удалось обнаружить единственную нервную клетку (Смирнов, Крупенко, 2023). Как было сказано выше, мы предполагаем, что поведение этого мирацидия может ограничиваться проникновением в кишечный эпителий; вероятно, экстремально редуцированной нервной системы должно быть достаточно ЛЛЯ выполнения лишь этой функции.

Генеративный материал мирацидиев Hemiurata

Генеративный материал исследованных нами личинок Hemiurata представлен недифференцированными клетками. Безусловно, и в случае *B. progenetica*, и в случае *D. varicus* сома редуцирована до такой степени, что после метаморфоза в материнскую спороцисту, этим организмам необходим материал для формирования новых

соматических элементов. Мы полагаем, что недифференцированные клетки плюрипотентны и их потомки принимают в построении новой сомы непосредственное участие. Различие в числе клеток генеративного материала (одна у *D. varicus* и 4-5 у *B. progenetica*) мы связываем с различиями в размере этих личинок.

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

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

Метаморфоз и материнская спороциста Hemiurata

К сожалению, метаморфоз мирацидия в материнскую спороцисту нельзя назвать хорошо исследованным процессом. Строение материнских спороцист "активных" форм описано светооптическими методами для весьма широкого круга представителей (Goodchild, 1948; Cort et al., 1951; Ameel et al., 1951, Crandall, 1960; Donges, 1964; Ataev,

Dobrovolskij, 1995). Однако, методами трансмиссионной электронной микроскопии исследованы лишь некоторые детали их строения (Smith, Chernin, 1974; Meuleman et al. 1980; Ataev et al., 1997). Материнские спороцисты «пассивных» форм исследован не лучше. Также имеется довольно много светооптических описаний материнских спороцист (Ameel et al., 1949; Madhavi, 1978; Cribb, 1986). Ранние стадии развития описаны лишь в нескольких работах, среди которых наиболее подробными являются исследования плагиорхиат (Cort et al., 1952; Schell, 1961,1962; Galaktionov, Dobrovolskij, 2003). Методами электронной микроскопии метаморфоз пассивных мирацидиев за редчайшими исключениями (Matthews, Matthews, 1991) не изучался.

Даже немногочисленных и очень разнородных данных по материнским спороцистам достаточно для того, чтобы сделать следующие выводы: метаморфоз мирацидиев всегда является регрессивным и катастрофическим; материнские спороцисты очень разнообразны по строению и стратегии освоения внутренней среды моллюска-хозяина (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003).

Причина и форма регрессивных изменений при метаморфозе «активных» мирацидиев кажется понятной. Активные личинки несут множество провизорных структур, которые материнской спороцисте попросту не нужны. «Пассивные» мирацидии – экстремально упрощенные организмы, и форма регрессивного метаморфоза уже редуцированных существ в этом случае не вполне ясна.

Метаморфоз гемиуридных мирацидиев был описан в нескольких работах (Ameel et al.; 1949, Madhavi, 1978; Matthews, Matthews, 1991). Эти описания нельзя назвать полными, так как они проливают свет на преобразования лишь некоторых структур. Тем не менее, опубликованных данных достаточно для того, чтобы утверждать: материнская спороциста гемиурид – организм, развивающийся в моллюске продолжительное время, способный к преумножению как соматических, так и генеративных элементов. Подтверждается такая трактовка и нашими данными.

Строение мирацидия *B. progenetica*, безусловно подверглось существенной редукции в связи с переходом к пассивной стратегии заражения. Метаморфоз этой личинки в материнскую спороцисту априори имеет гораздо меньше возможностей для регрессивных изменений, чем это наблюдается у «активных» форм. Согласно нашим данным, состав тела ранней материнской спороцисты *B. progenetica* не сильно отличается от состава тела мирацидия. Тем не менее, существенные структурные преобразования,

безусловно, происходят. Как и во всех описанных случаях метаморфоза (Southgate, 1970; Galaktionov, Dobrovolskij, 2003), мирацидии *B. progenetica* сбрасывают эпителиальные пластинки в ходе проникновения или миграции в ткани моллюска. Необычным образом формируется тегумент спороцисты – в этом процессе важную роль играют поперечные гиподермальные гребни. Последние, как описано выше, несут каналы, на внутренней поверхности которых расположены микровилли. При формировании тегумента эти каналы выворачиваются наружу, полностью заполняя его поверхность миковиллями. Любопытным кажется этот пример смены функции структуры после метаморфоза: каналы, выполнявшие функцию опоры для шипов мирацидия, начинают использоваться спороцистой в совершенно другом амплуа.

Уже спустя сутки после заражения тегумент материнской спороцисты очень активен. Попадая в гемолимфу моллюска, материнская спороциста сразу же начинает всасывать питательные вещества через тегумент, о чем, как мы полагаем, говорит увеличенная концентрация гранулярного содержимого гемолимфы вблизи тегумента. Для увеличения поверхности всасывания, формируются многочисленные каналы, пронизывающие пластинку тегумента.

Неожиданным оказалось сохранение апикальной железы после метаморфоза. Обычно апикальные железы мирацидиев рассматриваются как элементы аппарата проникновения, лишь в нескольких работах говорится о сохранении железы после метаморфоза (Ameel et al.; 1949; Lewert, Lee, 1954). В случае *B. progenetica* апикальная железа, безусловно, используется материнской спороцистой, о чем говорит степень активности этой клетки, как у однодневной, так и у двухнедельной спороцисты. Неизвестно, использует ли мирацидий апикальную железу для проникновения или же обходится одними шипами, но не исключено, что секрет апикальной железы обладает протеолитическим свойством, и необходим как в процессе проникновения, так и впоследствии. Вполне возможно, что секрет апикальной железы используется для создания определенной защитной среды вокруг спороцисты – наши данные показывают, что спустя две недели после заражения такая среда, представленная слоем, лишенным гемоцитов моллюска, уже сформирована.

Преобразования материнской спороцисты в первые две недели после заражения можно описать как интенсивное наращивание соматических элементов. Поразителен скачок в развитии мускулатуры, который происходит со спороцистой фактически за один

103

день. Мы полагаем, что появление новых мышечных клеток осуществляется за счет пролиферации и дифференциации плюрипотентных недифференцированных клеток. Процессов деления и дифференцировки мы, к сожалению, не наблюдали, но других клеток, из которых могли бы формироваться соматические элементы, у спороцисты *B. progenetica* попросту нет. Мы предполагаем, что при формировании мышечной клетки из предшественника происходит его сближение с базальной пластинкой и постройка волокна. К сожалению, нам не удалось обнаружить следы этого процесса; вероятно, дифференцирующиеся клетки оказались «экранированы» миоцитонами, которые в большом количестве попадаются на срезах.

Из недифференцированных же клеток, как мы полагаем, формируются и новые цитоны тегумента, число которых спороциста постепенно наращивает, долгое время сохраняя цитон, «унаследованный» от мирацидия.

К сожалению, нам осталось неизвестно, в какой момент запускается процесс дифференцировки клеток генеративного ряда. Внутреннее строение двухнедельной спороцисты становится более «рыхлым» и вполне возможно, происходят начальные этапы формирования шизоцеля, в котором начнут свое развитие особи дочернего поколения. Мы полагаем, что развитие материнской спороцисты *B. progenetica* сопоставимо с описанным развитием другого представителя гемиурид – *Halipegus* (Ameel et al., 1949). Однако, темпы роста спороцисты Halipegus явно выше и уже на 11-й день инфекции в теле имеется полость с развивающимися эмбрионами.

3.5.3 Мирацидии Opisthorchiata

Среди довольно многочисленных светооптических описаний мирацидиев описторхиат, наибольшее соответствие нашей реконструкции мы видим в работах Фогеля (Vogel, 1934) по личинке *Opisthorchis*, Вышкварцевой (Вышкварцева, 1969) по личинке *Metorchis* и Посохова (Посохов, 1972) по *Clonorchis*. Схема Фогеля почти полностью повторяет полученную нами схему (за исключением трактовок структур). То обстоятельство, что рода *Opisthorchis, Clonorchis* и *Cryptocotyle* не являются близкородственными, традиционно относятся к разным семействам (Opisthorchiidae и Heterophyidae), позволяет говорить о высокой консервативности строения мирацидия в пределах группы Opisthorchiata. Общий уровень редукции гетерофиатного мирацидия сопоставим с другими описанными нами личинками, что позволяет проводить определенные параллели, но в деталях видны признаки, отличающие этого мирацидия от остальных.

Покровы мирацидиев Opisthorchiata

Для мирацидия *C. lingua* характерно существенное сокращение ресничного аппарата. Всего четыре клетки слагают его покровы. В сравнении с личинками плагиорхиат (Schell, 1961; Dobrovolskij, 1965), для которых характерно два ряда эпителиальных пластинок по три клетки каждый, количество клеток заднего ряда у гетерофиатного мирацидия уменьшилось до одной. Судя по нашим наблюдениям за мирацидием *C. lingua* в мазке кишечного содержимого моллюска, личинка в бо́льшей степени использует мышечное сокращение для передвижения. Тем не менее, эпителиальные пластинки мирацидия, связанные с гиподермальными гребнями, формируют типичные для этой стадии покровы. В сравнении с другими описанными нами пассивными личинками, необычным кажется то, что гиподермальные гребни связаны с двумя цитонами. Вероятно, два цитона выполняют разную функцию – об этом позволяет говорить различие в производимом ими секрете. Мы полагаем, что передний цитон принимает активное участие в процессе проникновения (см. ниже), а вот секрет заднего скорее всего играет важную роль уже после метаморфоза.

Мускулатура мирацидиев Opisthorchiata

В организации мышечного аппарата мирацидия *C. lingua* мы видим признаки редукции продольной мускулатуры – той же тенденции, которую мы наблюдали у личинок буцефалят. Единственная продольная мышечная клетка, наблюдаемая у личинки *C. lingua*, в точности напоминает нам картину, характерную для мирацидия *Pr. squamatus* (Bucephalidae). Безусловно, это сходство является результатом независимой эволюции, тем не менее, оно демонстрирует пример общей для «пассивных» мирацидиев тенденции редукции продольных мышечных элементов. Не вполне ясна логика в проявлении этой тенденции, поскольку по нашим наблюдениям мирацидий *C. lingua* все-таки использует мышцы при перемещении в кишке моллюска. Редукция продольной мускулатуры должна скорее затруднять этот процесс.

Аппарат проникновения мирацидиев Opisthorchiata

Мы полагаем, что в процессе проникновения в кишечный эпителий мирацидий *C. lingua* использует две структуры: железу проникновения и передний гиподермальный цитон. Обе клетки формируют протоки, которые открываются на переднем конце в непосредственной близости от сенсиллы. Вероятно, после стимуляции рецептора фактором, исходящим от кишечного эпителия, происходит выброс содержимого этих клеток. Так как мирацидий *C. lingua* не несет никакого вооружения, именно этот секрет должен оказывать литическое действие на клетки кишечного эпителия моллюска, позволяя личинке проникнуть в его ткани. Не исключено, что цитон гиподермы сохраняет свою активность и после внедрения, а вот железа проникновения, как мы полагаем, полностью используется в этом процессе. К моменту полной зрелости личинки эта железа забита секретом, и происходит резорбция ядра. Вполне вероятно, что секрет одного из железистых элементов мирацидия используется для «приклеивания» к эпителию кишки моллюска.

Трактовка крупной железы с протоком (Вышкварцева, 1969) в мирацидии Metorchis как железы вылупления не соответствует нашим наблюдениям за личинкой Cryptocotyle в мазке кишечного содержимого. Нам удалось наблюдать активное выделение секрета по этому протоку уже после вылупления. Вероятно, трактовка Вышкварцевой была основана на данных о плагиорхиатных мирацидиях, для которых сходные структуры были описаны как железы вылупления (Dobrovolskij, 1965). Обходя стороной вопросы трактовки, важно заметить, что расположение желез в плагиорхиатном и описторхиатном мирацидиях действительно идентично. Различия касаются числа ядер внутри этих клеток, но в случае мирацидиев этот признак, судя по всему, не является постоянным. Сходство между этими мирацидиями было отмечено и до выполненной нами ПЭМ-реконструкции гетерофиатной личинки (Вышкварцева, 1969), и наши данные подтверждают существование этого сходства. Вопрос открыт, является ли этот признак (расположение железистых элементов) гомологичным для плагиорхиат и описторхиат или же их личинки пришли к одному результату разными путями. С одной стороны, гомоплазия вполне естественна при переходе к новым условиям существования (Gibson, 1987), с другой стороны, мирацидии филогенетически близких представителей (например, личинки Fellodistomidae и Gymnophallidae) могут существенно различаться.

Только детальная реконструкция мирацидия плагиорхиат, вкупе с качественным филогенетическим анализом могут внести ясность в эти вопросы.

Нервная система мирацидиев Opisthorchiata

Уровень редукции нервной системы мирацидия C. lingua примерно соответствует тому, что мы наблюдали у других «пассивных» личинок. Это очередной пример некого состояния, «минимального» достаточного для выполнения главной задачи (проникновения). Избавляясь ОТ необходимости поиска хозяина, мирацидии подвергаются колоссальной редукции нервной системы, и, судя по всему, достигают примерно одного уровня упрощения в разных филогенетических ветвях. Имеющихся у нас данных недостаточно, чтобы судить о том, как функционируют такие простые нервные системы. Не исключено, что различия между малоклеточными нервными филогенетически далеких дигеней кроются системами личинок В каких-то цитологических особенностях организации их нервов.

Выделительная система мирацидиев Opisthorchiata

Устройство выделительной системы мирацидия C. lingua полностью соответствует таковому у мирацидия Pr. squamatus (Bucephalidae). В обоих случаях мирацидий несет единственный протонефридий с небольшим количеством ресничек. Интересная особенность протонефридия мирацидия C. lingua заключается в том, что его реснички скреплены десмосомами. Этот необычный факт можно объяснить двумя способами. Безусловно, такое объединение ресничек должно увеличивать эффективность протонефридия. Не исключено, что циртоцит, несущий сильно редуцированный ресничный аппарат, в определенный момент «перестал справляться» с вызовами среды, не смог в достоточной степени справляться с поддержанием постоянства осмомолярности внутренней среды мирацидия, и связь базальных частей ресничек возникла как ответ на такие условия. В таком случае мы имеем дело с двумя противоположными тенденциями: протонефридий одновременно и редуцирован, и специализирован. С другой стороны, мы можем предположить, что подобные «вызовы среды» были актуальны для какой-то другой стадии, и скрепленные десмосомами реснички достались всем другим стадиям жизненного цикла «по наследству». К сожалению, к сегодняшнему дню отсутствует детальное ультраструктурное описание протонефридиев у других стадий жизненного

цикла *C. lingua*, и мы не можем ни подтвердить, ни опровергнуть ни одну из наших гипотез.

Так или иначе, выделительная система мирацидия *C. lingua* безусловно подверглась существенной редукции, что в очередной раз подтверждает эту общую для «пассивных» личинок тенденцию.

3.5.4 «Мирацидий» Notocotylidae

«Мирацидий» Notocotylidae давно привлек внимание исследователей, поскольку является примером крайней степени редукции среди «пассивных» мирацидиев. Несколько парадоксальным образом получилось, что нотокотилидная личинка долгое время оставалась фактически единственной исследованной методами просвечивающей электронной микроскопии «пассивной» личинкой (Murrils et al., 1985). Исследования мирацидия Notocotylus attenuatus продемонстрировали, насколько глубоко может заходить процесс упрощения строения мирацидия после перехода к пассивной стратегии заражения, не зная деталей того, как происходит этот процесс в других группах дигеней. По понятным причинам, связанным с методическими трудностями работы с «пассивными» мирацидиями, электронограммы, полученные Муррилсом с коллегами, не отличаются высоким качеством, и в публикации приведено лишь две фотографии срезов, по которым сложно судить о правдоподобности описания содержимого яйца. В связи с этим, нами было проведено исследование нотокотилидного яйца с целью проверки и уточнения результатов Муррилса и коллег (Murrils et al., 1985). В первую очередь нас интересовали вопросы природы оперкулярного тяжа, и детали организации генеративных клеток. Также мы хотели узнать, действительно ли нотокотилидная личинка утратила все признаки мирацидия, фактически досрочно превратившись в материнскую спороцисту.

Стоит сказать, что описание Муррилса и коллег (Murrils et al., 1985) выдержало проверку и общая схема строения нотокотилидного яйца подтвердилась. Нами было уточнено строение опрекулярного тяжа и определена его природа: он оказался частью, подстилающей оболочку яйца желточной мембраны. Согласно наблюдениям Муррилса и др. за процессом вылупления *in vitro*, оперкулярный тяж является аппаратам экструзии «мирацидия». По этому описанию после того, как крышечка открывается, оперкулярный тяж «выстреливает» наружу, вытягиваясь в длинный шнур, по просвету которого выходит
«спороциста». Муррилс и коллеги выдвинули предположение (Murrils et al., 1985), что при заражении моллюска этот шнур пробивает его кишечный эпителий и доставляет хозяина. Это весьма «спороцисту» В гемоцель предположение выглядит правдоподобным. Зная то, что другие «пассивные» формы используют ДЛЯ проникновения структуры, которые исходно выполняли другую функцию (например, шипы у мирацидиев Hemiurata), такая специализация желточной мембраны не кажется столь удивительной. Тем не менее, возникает вопрос, как спороциста попадает в просвет оперкулярного тяжа, находясь снаружи от него. На наших срезах через крышечку яйца видно, что один из концов оперкулярного тяжа связан со скорлупкой в районе крышечки – это соответствует и фотографиям, которые приводит Муррилс (Murrils et al., 1985). При крышечки оперкулярный тяж выворачивается наизнанку подобно открывании стрекательной нити книдоцитов, что позволяет спороцисте попасть в просвет тяжа.

Наши данные подтверждают полную редукцию соматических элементов нотокотилидного «мирацидия», и трактовку Муррилса и др. содержимого яйца как материнской спороцисты мы считаем верной. Действительно, у этой спороцисты сформирован тегумент, который готов к встрече с внутренней средой моллюска – в его толще имеется множество гранул секрета и активный белоксинтезирующий аппарат. Тегумент укрывает группу клеток, которые мы трактуем как генеративные. Несколько необычным кажется то, что эти клетки формируют отростки – не вполне ясна их функция. Электронно-плотные тельца, наблюдаемые в цитоплазме этих клеток, мы трактуем как «нуаж» - достоверный признак специализации клеток половой линии (Klag et al., 1997). Судя по нашим наблюдениям, число генеративных клеток в составе спороцисты может варьировать, что соотносится с различием в количестве редий внутри спороцисты после заражения моллюска (Kanev et al., 1994).

Сразу после проникновения в ткани моллюска в спороцисте начинается процесс развития особей дочернего поколения. Поражает темп этого развития: уже через две недели мы наблюдали небольших подвижных редий со сформированной глоткой.

Резюмируя то, что известно о нотокотилидной личинке и ее судьбе, можно сказать, что и мирацидий, и материнская спороциста представителей этого семейства подверглись существенной редукции. В ходе эволюции, мирацидий Notocotilidae приобрел внешний механизм, доставляющим его во внутреннюю среду моллюска. Функцию аппарата проникновения взяла на себя желточная мембрана яйца. Это обстоятельство полностью

109

избавило эту стадию от необходимости участвовать хоть в каких-то процессах, связанных с проникновением в хозяина, что привело к полному исчезновению соматических элементов, которые мы привыкли видеть у мирацидиев. Существенно редуцировалась материнская спороциста — фактически, она представлена тончайшей пластинкой тегумента, на основе которой не может развиться полноценный организм. Можно предположить, что спороциста упростилась «по инерции» от редукции мирацидия. В результате сокращения числа соматических элементов до минимума могло оказаться невыгодным или даже невозможным заново «отстраивать» организм материнской спороцисты. Однако, можно предложить и альтернативный сценарий, при котором редукция спороцисты никак не связана с изменениями мирацидия. Среди дигеней известно довольно много примеров полного исчезновения материнской спороцисты как стадии. Например, это характерно для «живородящих» представителей семейств Сусlосоеlidae, Philophthalmidae (Тихомиров, 1983). Не исключено, что предковый для нотокотилидной личинки «активный» мирацидий был именно таким.

Таблица 1. «Пассивные» мирацидии и общая харакетристика их клетончых систем

Мирацидий (семейство)	Аппарат проникновения	Покровы	Мускулатура	Нервная система	Выделительная система	Генеративный материал
<i>Prosorhynchus squamatus</i> (Bucephalidae)	апикальная железа, снабженная стилетом; цитон гиподермы	два ряда ресничных эпителиальных пластинок	кольцевые волокна, единственная продольно ориентированная мышечная клетка, клетка- протрактор стилета	два нейрона	единственный протонефридий	две недифференцированных клетки
Steringophorus furciger (Fellodistomidae)	апикальная железа	два ряда ресничных эпителиальных пластинок	кольцевые волокна, шесть продольно ориентированных мышечных клеток	два нейрона	отсутствует	две недифференцированных клетки
<i>Parvatrema affine</i> (Gymnophallidae)	апикальная железа; кристаллические железы	два ряда ресничных эпителиальных пластинок; безресничная клетка (протегумент)	только кольцевые волокна	два нейрона	отсутствует	одна недифференцированная клетка
<i>Derogenes varicus</i> (Derogenidae)	шипы эпителиальных пластинок; апикальная железа; "тёмные" железы	три эпителиальные пластинки с шипами и ресничками; тегумент	кольцевые волокна; мышечные клетки- ретракторы переднего конца	один нейрон	отсутствует	одна недифференцированная клетка
Bunocotyle progenetica (Hemiuridae)	шипы эпителиальных платинок; апикальная железа	три эпителиальные пластинки с шипами	кольцевые волокна; продольно ориентированные мышечные клетки; мышечные клетки- ретракторы переднего конца	три-четыре нейрона	отсутствует	четыре-пять неифференцированных клетки
Cryptocotyle lingua (Heterophyidae)	железа проникновения; цитоны гиподермы	два ряда ресничных эпителиальных пластинок	кольцевые волокна; единственная продольно ориентированная мышечная клетка	один нейрон	единственный протонефридий	четыре недифференцированных клетки
Paramonostomum alveatum (Notocotylidae)	оперкулярный тяж	тегумент	отсутствует	отсутствует	отсутствует	две-три генеративные клетки

Заключение

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

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

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

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

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

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

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

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

Выводы

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

Список использованной литературы

- Вышкварцева, Н. В. Морфология фаз развития сосальщика Metorchis intermedius (Opisthorhiidae) из баклана / Н. В. Вышкварцова // Паразитология. – 1969. – Т. 3, № 4. – С. 346–353.
- Галактионов, К. В. Гермафродитное поколение трематод / К. В. Галактионов, А. А. Добровольский. – Ленинград: Наука. Ленингр. отд-ние, 1987. – С. 1–194.
- Галактионов, К. В. Жизненные циклы трематод как компоненты экосистем (опыт анализа на примере представителей семейства Microphallidae) / К. В. Галактионов // Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук в форме научного доклада. – 1993. – С. 1–44.
- Гинецинская, Т. А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция / Т. А. Гинецинская. – Ленинград: Наука. Ленингр. отд-ние, 1968. – С. 1–264.
- Гинецинская, Т. А. Жизненный цикл и биология стадий развития Cyclocoelum microstomum (Trematoda) / Т.А. Гинецинская // Ученые записки Ленинградского Университета. – 1954 – Т. 172 – С. 90–112.
- Добровольский, А. А. Партеногенетические поколения трематод / А. А. Добровольский, К. В. Галактионов, Г. К. Мухамедов, Б. К. Синха, И. А. Тихомиров. Ленинград: Ленинградский государственный университет. 1983 С. 1–108.
- Посохов, П. С. Морфология фаз развития трематоды *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) Looss, 1907 / П. С. Посохов // М., Мед. паразитол. 1974. Т. 41, № 5. С. 548-559.
- Семенов, О. Ю. Мирацидии: Строение, биология и взаимоотношения с моллюсками / О. Ю. Семенов // Л., ЛГУ. – 1991. – С. 1–203.
- Смирнов, П. А. Реконструкция строения мирацидия *Derogenes varicus* (Digenea: Derogenidae): первое ультраструктурное описание шипов на поверхности личинок Hemiurata. / П.А. Смирнов, Д.Ю. Крупенко // Паразитология. – 2023. – Т. 57, №2. – С. 108–123.
- Тихомиров, И. А. Микроанатомия мирацидия *Philophthalmus rhionica* (Trematoda: Philophthalmidae). / И. А. Тихомиров // Паразитология. 2000. Т. 34, №3 С. 210-221.
- 11. Albaret, J. L. Structures argyrophiles superficielles du miracidium de *Fascioloides magna* (Bassi, 1875)(Trematoda, Fasciolidae, Fasciolinae). Interet epidemiologique / J.

L. Albaret, T. Balbo // Annales de parasitologie humaine et comparée. – 1985. – Vol. 60, N 2. – P. 213-216.

- 12. Alicata, J. E. The Life Cycle of *Postharmostomum gallinum*, the Cecal Fluke of Poultry
 / J. E. Alicata // The Journal of Parasitology. 1940. Vol. 26, N 2. P. 135 143.
- Allison, L. N. *Leucochloridiomorpha constantiae* (Mueller)(Brachylaemidae), its life cycle and taxonomic relationships among digenetic trematodes / L. N. Allison // Transactions of the American Microscopical Society. 1943. Vol. 62, N 2. P. 127–168.
- 14. Ameel, D. J. Development of the mother sporocyst and rediae of *Paragonimus kellicotti* Ward, 1908 / D. J. Ameel, W. W. Cort, A. Van der Woude // The Journal of Parasitology. 1951. Vol. 37, N 4. P. 395–404.
- 15. Ameel, D. J. Germinal development in the mother sporocyst and redia of *Halipegus eccentricus* Thomas, 1939 / D. J. Ameel, W. W. Cort, A. Van der Woude // The Journal of Parasitology. 1949. Vol. 35, N 6. P. 569–578.
- 16. Anderson, M. G. Life history of *Proterometra dickermani* Anderson, 1962 / M. G. Anderson, F. M. Anderson // The Journal of Parasitology. 1963. Vol. 49, N. 2. P. 275–280.
- 17. Ataev, G.L. Migration and development of mother sporocysts of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae) / G. L. Ataev, A. A. Dobrovolskij, A. Fournier, J. Jourdane // The Journal of parasitology. 1997. Vol. 83, N 3. P. 444–453.
- 18. Baylis, H. A. On two species of the trematode genus *Didymozoon* from the mackerel / H.
 A. Baylis // Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 1938.
 Vol. 22, N 2. P. 485–492.
- 19.Blasco-Costa, I. Molecular approaches to trematode systematics: 'best practice' and implications for future study / I. Blasco-Costa, S. C. Cutmore, T. L. Miller, M. J. Nolan // Systematic Parasitology. – 2016. – Vol. 93, N 3. – P. 295–306.
- 20. Bronn, H. G. Klassen und Ordnungen des Their-Reichs. *4.*/ H.G. Bronn. Leipzig: 1889. P. 1–579.
- 21. Brooks, D. R. Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptive radiation / D. R. Brooks, R. T. O'Grady, D. R. Glen // Canadian Journal of Zoology. – 1985. – Vol. 63, N 2. – P. 411–443.

- 22. Chernin, E. The influence of host-parasite dispersion upon the capacity of *Schistosoma mansoni* miracidia to infect *Australorbis glabratus* / E. Chernin, C. A. Dunavan // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1962. Vol. 11, N 4. P. 455–471.
- 23. Coe, W. R. Notizen über den Bau des Embryos von *Distomum hepaticum* / W. R. Coe //
 Zool. Jahrb. Abt. f. Anat. u. Ont. 1896. Vol. 9. P. 561–570.
- 24. Collins, J. J. An atlas for *Schistosoma mansoni* organs and life-cycle stages using cell type-specific markers and confocal microscopy / J. J. Collins III, R. S. King, A. Cogswell, D. L. Williams, P. A. Newmark // PLoS neglected tropical diseases. 2011. Vol. 5, N 3. P. e1009.
- 25. Cort, W. W. Development of the mother and daughter sporocysts of a snake plagiorchioid, *Lechriorchis primus* (Trematoda: Reniferidae) / W. W. Cort, D. J. Ameel, A. Van der Woude // The Journal of Parasitology. 1952. Vol. 38, N 3. P. 187–202.
- 26. Cort, W. W. Early developmental stages of strigeid mother sporocysts / W. W. Cort, D. J. Ameel, A. Van der Woude // Proc. Helminthol. Soc. Wash. 1951. Vol. 18. P. 5–9.
- 27. Cribb, T.H. Life cycle evolution in the Digenea: a new perspective from phylogeny / T.
 H. Cribb, R. A. Bray, P. D. Olson, D. T. J. Littlewood // Advances in parasitology. –
 2003. Vol. 54, N 1. P. 197–254.
- 28. Cribb, T. H. The Life-Cycle and Morphology of *Stemmatostoma pearsoni*, Gen Et Sp-Nov, With Notes on the Morphology of *Telogaster-Opisthorchis* Macfarlane (Digenea, Cryptogonimidae) / T. H. Cribb // Australian Journal of Zoology. – 1986. – Vol. 34, N 2. – P. 279–304.
- 29. Dobrovolskij, A. A. Uber die Eincheitlichkeit des Bauplanes von Mirazidien der Uberfamilie Plagiorchioidea / A. A. Dobrovolskij // Angew. Parasitol. – 1965. – Vol. 6, N 3. – P. 157–165.
- 30. Dronen Jr, N. O. The life cycle of *Haematoloechus coloradensis* Cort 1915 (Digenea: Plagiorchiidae), with emphasis on host susceptibility to infection / N. O. Dronen Jr // The Journal of parasitology. 1975. Vol. 61, N 4. P. 657–660.
- 31. Dunn, T. S. Ultrastructural and histochemical observations on the epidermis, presumptive tegument and glands of the miracidium of *Gigantocotyle explanatum* (Trematoda:

Paramphistomidae) / T. S. Dunn, R. E. B. Hanna, W. A. Nizami // International journal for parasitology. – 1987. – Vol. 17, N 4. – P. 885–895.

- 32. Dönges, J. The miracidium of *Isthmiophora melis* (Schrank, 1788)(Echinostomatidae)
 Ecology and morphological features / J. Dönges // Zeitschrift für Parasitenkunde. 1973.
 Vol. 41. P. 215–230.
- 33. Faust, E. C. Studies on *Clonorchis sinensis* (Cobbold). / E. C. Faust // Human Helminthology. Amer J. Hyg. Monogr. Ser. – 1929. – Vol. 8. – P. 1–284.
- 34. Faltýnková, A. Another plea for 'best practice' in molecular approaches to trematode systematics: *Diplostomum* sp. clade Q identified as *Diplostomum baeri* Dubois, 1937 in Europe / A. Faltýnková, O. Kudlai, C. Pantoja, G. Yakovleva, D. Lebedeva // Parasitology. – 2022. – Vol. 149, N 4. – P. 503–518.
- 35. Galaktionov, K. V. The biology and evolution of trematodes: an essay on the biology, morphology, life cycles, transmissions, and evolution of digenetic trematodes / K. V. Galaktionov, A. Dobrovolskij. Springer Science & Business Media, 2003. – P. 1–592.
- 36. Gibson, D. I. Questions in digenean systematics and evolution / D. I. Gibson // Parasitology. 1987. Vol. 95, N 2. P. 429–460.
- 37. Goodchild, C. G. Additional observations on the bionomics and life history of *Gorgodera amplicava* Looss, 1899 (Trematoda: Gorgoderidae) / C. G. Goodchild // The Journal of Parasitology. 1948. Vol. 34, N 5. P. 407–427.
- 38. Hsu, P. K. A comparative study of the early larval stages of some heterophyid trematodes belonging to the genera *Haplorchis* and *Procerovum* (Trematoda: Heterophyidae) / P. K. Hsu // Lingnan Science Journal. – 1951. – Vol. 23. – P. 235–256.
- 39. Hussey, K. L. The miracidium of *Proterometra macrostoma* (Faust) Horsfall 1933 / K.
 L. Hussey // The Journal of Parasitology. 1945. Vol. 31, N 4. P. 269–271.
- 40. Jones, M. K. Correlative and dynamic imaging of the hatching biology of *Schistosoma japonicum* from eggs prepared by high pressure freezing / M. K. Jones, S. H. Bong, K. M. Green, P. Holmes, M. Duke, A. Loukas, D. P. McManus // PLoS Neglected Tropical Diseases. 2008. Vol. 2, N 11. P. e334.
- 41. Kagan, I. G. Further contributions to the life history of *Neoleucochloridium problematicum* (Magath, 1920) new comb. (Trematoda: Brachylaemidae) / I. G. Kagan // Transactions of the American Microscopical Society. 1952. Vol. 71, N 1. P. 20–44.

- 42. Kanev, I. Life-cycle, delimitation and redescription of *Catatropis verrucosa* (Frölich, 1789) Odhner, 1905 (Trematoda: Notocotylidae) / I. Kanev, I. Vassilev, V. Dimitrov, V. Radev // Systematic Parasitology. 1994. Vol. 29. P. 133–148.
- 43. Klag, J. Ultrastructural studies on the sporocyst wall of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Digenea, Diplostomidae) / J. Klag, K. Niewiadomska, A. Czubaj
 // International journal for parasitology. – 1997. – Vol. 27, N 8. – P. 919–929.
- 44. Kniskern, V. B. Studies on the trematode family Bucephalidae Poche, 1907, Part II: the life history of *Rhipidocotyle septpapillata* Krull, 1934 / V. B. Kniskern // Transactions of the American Microscopical Society. – 1952. – Vol. 71, N 4. – P. 317–340.
- 45. Klag, J. Ultrastructural studies on the sporocyst wall of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Digenea, Diplostomidae) / J. Klag, K. Niewiadomska, A. Czubaj
 // International journal for parasitology. – 1997. – Vol. 27, N 8. – P. 919–929.
- 46. La Rue, G. R. The classification of digenetic Trematoda: a review and a new system / G.
 R. La Rue // Experimental Parasitology. 1957. Vol. 6, N 3. P. 306–349.
- 47. Leuckart, R. Zur Entwicklungsgeschichte des Leberegels (*Distomum hepaticum*) / R. Leuckart // Arch. Naturg. Berlin. 1882. Vol. 48, N 1. P. 80–119.
- 48. Lewert, R. M. Studies on the passage of helminth larvae through host tissues: I. Histochemical studies on the extracellular changes caused by penetrating larvae II. Enzymatic activity of larvae in vitro and in vivo / R. M. Lewert, C. Lee // The Journal of Infectious Diseases. 1954. Vol. 95, N 1. P. 13–51.
- 49. Lewis, J. W. Studies on the life history of *Brachylaimus oesophagei* Shaldybin, 1953 (Digenea: Brachylaimidae) / J. W. Lewis // Journal of Helminthology. 1969. Vol. 43, N 1-2. P. 79–98.
- 50. Looss, A. Die Distomen unserer Fische und Frösche: Neue Untersuchungen über Bau und Entwickelung des Distomenkörpers / A. Looss. Harvard: E. Nägele, 1894. P. 1–296.
- 51. Luhe, M. Parasitische Plattwurmer. I. Trematodes / M. Luhe // Die Susswasserfauna Deutschlands. 1909. Vol. 17. P. 12–17.
- 52. Lynch, J. E. Memoirs: The Miracidium of *Heronimus chelydrae* MacCallum / J. E. Lynch
 // Journal of Cell Science. 1933. Vol. 2, N 301. P. 13–33.
- 53. Madhavi, R. Life history of *Genarchopsis goppo* Ozaki, 1925 (Trematoda: Hemiuridae) from the freshwater fish *Channa punctata* / R. Madhavi // Journal of Helminthology. – 1978. – Vol. 52, N 3. – P. 251–259.

- 54. Mason, P. R. Chemical stimulation of *Schistosoma mansoni* miracidial activity / P. R. Mason, P. J. Flipp // Zeitschrift f
 ür Parasitenkunde. 1977. Vol. 53, N 3. P. 287–295.
- 55. Mattes, O. Wirtsfindung, Invasionsvorgang und Wirtsspezifität beim Fasciola-Miracidium / O. Mattes // Zeitschrift für Parasitenkunde. – 1949. – Vol. 14, N 4. – P. 320–363.
- 56. Matthews, B. F. Lecithochirium furcolabiatum (Jones, 1933), Dawes 1947: The miracidium and mother sporocyst / B. F. Matthews, R. A. Matthews // Journal of helminthology. 1991. Vol. 65, N 4. P. 259–269.
- 57. McMichael-Phillips, D. F. Ultrastructural studies on the miracidium of Sanguinicola inermis (Digenea: Sanguinicolidae) / D. F. McMichael-Phillips, J. W. Lewis, M. C. Thorndyke // Parasitology. – 1992. – Vol. 105, N 3. – P. 435–443.
- 58. Mercer, E. H. An electron microscopic study of *Amoeba proteus* / E. H. Mercer // Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. – 1959. – Vol. 150, N 939. – P. 216–232.
- 59. Meuleman, E. A. The development of daughter sporocysts inside the mother sporocyst of *Schistosoma mansoni* with special reference to the ultrastructure of the body wall / E. A. Meuleman, P. J. Holzmann, R. C. Peet // Zeitschrift für Parasitenkunde. – 1980. – Vol. 61. – P. 201–212.
- 60. Miller, J. N. (1936). A study of *Brachylaima (Postharmostomum) sexconvolutum* n.sp., a trematode parasite of the deer mouse/ J.N. Miller // Abstr. Doct. Diss. Ohio Univ. 1936 Vol. 19 P. 81-86.
- 61. Murrills, R. J. Studies on the invasion of *Notocotylus attenuatus* (Notocotylidae: Digenea) into its snail host *Lymnaea peregra*: the contents of the fully embryonated egg / R. J. Murrills, T. A. J. Reader, V. R. Southgate // Parasitology. 1985. Vol. 91, N 2. P. 397–405.
- 62. Murugesh, M. Egg and miracidium of *Hirudinella ventricosa* (Trematoda: Hirudinellidae). / M. Murugesh, R. Madhavi // The Journal of parasitology. 1990. Vol. 76, N 5. P. 748–749.
- Odening, K. Historische und moderne Gesichtspunkte beim Aufbau eines natürlichen Systems der digenetischen Trematoden / K. Odening // Biol Beitr. – 1961. – T. 1. – C. 73–90.

- 64. Odening, K. Verwandtschaft, System und zyklo-ontogenetische Besonderheiten der Trematoden / K. Odening // Zoologischer Jahrbucher. Systematik. – 1974. – 101. – P. 345-96.
- 65. Olson, P.D. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) /
 P. D. Olson, T. H. Cribb, V. V. Tkach, R. A. Bray, D. T. J. Littlewood // International journal for parasitology. 2003. Vol. 33, N 7. P. 733–755.
- 66. Pan, S. C. The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni* / S. C. Pan // Journal of invertebrate Pathology. 1980. Vol. 36, N 3. P. 307–372.
- 67. Perkins, K. W. Studies on the morphology and biology of *Acetodextra amiuri* (Stafford)(Trematoda: Heterophyidae) / K. W. Perkins // American Midland Naturalist. 1956. Vol. 55, N 1. P. 139–161.
- 68. Pinheiro, J. Ultrastructure of the miracidium of *Echinostoma paraensei* Lie and Basch, 1967 (Trematoda, Echinostomatidae) / J. Pinheiro, A. Maldonado, M. Attias, R. M. Lanfredi // Parasitology Research. 2005. Vol. 97. P. 367–372.
- 69. Prechel, D. P. Responses of Megalodiscus temperatus miracidia to amino and sialic acids found in snail-conditioned water / D. P. Prechel, G. D. Cain, P. M. Nollen // The Journal of Parasitology. – 1976. – Vol. 62, N 5. – P. 693–697.
- 70. Rankin, J. S. A review of the trematode genus *Glypthelmins* Stafford, 1905, with an account of the life cycle of *G. quieta* Stafford, 1905 / J. S. Rankin // Transactions of the American Microscopical Society. 1944. Vol. 63, N 1. P. 30–43.
- 71. Reissinger, E. Die Emunktorion des Mirazidium von Schistosoma hamatobium Bilharz, nebst einigen Beitragen zu dessen Anatomie und Histologie / E. Reissinger // Zool. Anz. 1923. Vol. 35 P. 1–20.
- 72. Robinson, E. J. The life history of *Postharmostomum helicis* (Leidy, 1847) n. comb. (Trematoda: Brachylaemidae) / E. J. Robinson // The Journal of Parasitology. – 1949. – Vol. 35, N 5. – P. 513–533.
- 73. Schauinsland, H. Beitrag zur Kenntniss der Embryonalentwicklung der Trematoden / H. Schauinsland. Gustav Fischer, 1883. P. 1–68.
- 74. Schell, S. C. Development of mother and daughter sporocysts of *Haplometrana intestinalis* Lucker, a plagiorchioid trematode of frogs / S. C. Schell // The Journal of Parasitology. 1961. Vol. 47, N 3. P. 493–500.

- 75. Schell, S. C. Development of the sporocyst generations of *Glypthelmins quieta* (Stafford, 1900)(Trematoda: Plagiorchioidea), a parasite of frogs / S. C. Schell // The Journal of Parasitology. 1962. Vol. 48, N 3. P. 387–394.
- 76. Schell, S. C. The life history of *Phyllodistomum staffordi* Pearse, 1924 (Trematoda: Gorgoderidae Looss, 1901) / S. C. Schell // The Journal of Parasitology. 1967. Vol. 53, N 3. P. 569–576.
- 77. Schell, S. C. The life history of *Sanguinicola idahoensis* sp. n.(Trematoda: Sanguinicolidae), a blood parasite of steelhead trout, *Salmo gairdneri* Richardson / S. C. Schell // The Journal of Parasitology. 1974. Vol. 60, N 4. P. 561–566.
- 78. Schell, S. C. The miracidium of *Lecithaster salmonis* Yamaguti, 1934 (Trematoda: Hemiuroidea) / S. C. Schell // The Journal of Parasitology. 1975. Vol. 61, N 3. P. 562–563.
- 79. Schmidt-Rhaesa, A. The Evolution of Organ Systems / A. Schmidt-Rhaesa. Oxford: Oxford University Press, 2007. – 396 p.
- 80. Self, J. T. The egg, miracidium, and adult of *Nematobothrium texomensis* (Trematoda: Digenea) / J. T. Self, L. E. Peters, C. E. Davis // The Journal of Parasitology. 1963. Vol. 49, N 5. P. 731–736.
- 81. Shameem, U. The morphology, life-history and systematic position of *Haplorchoides mehrai* Pande & Shukla, 1976 (Trematoda: Heterophyidae) / U. Shameem, R. Madhavi // Systematic parasitology. 1988. Vol. 11, N 1. P. 73–83.
- 82. Smirnov, P. A. Fine structure of a tiny gymnophalloid miracidium (Digenea) / P. A. Smirnov, A. A. Dobrovolskij // Journal of Morphology. 2021. Vol. 282, N 9. P. 1374–1381.
- 83. Smirnov, P. A. Miracidium of *Steringophorus furciger* (Digenea: Fellodistomidae) and other passive Bucephalata larvae / P. A. Smirnov, A. Gonchar // Zoomorphology. 2023. Vol. 142, N 1. P. 1–11.
- 84. Smirnov, P. A. What is hidden under an eggshell? Ultrastructural evidence on morphology of" passive" *Prosorhynchus squamatus* miracidium (Digenea: Bucephalidae) / P. A. Smirnov, A. A. Dobrovolski // Invertebrate Zoology. 2019. Vol. 16, N 4. P. 361–376.

- 85. Smith, J. H. Ultrastructure of young mother and daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni* / J. H. Smith, E. Chernin // The Journal of Parasitology. 1974. Vol. 60, N 1. P. 85–89.
- 86. Smyth, J. D. The physiology of trematodes / J. D. Smyth, D. W. Halton. Cambridge: CUP Archive, 1983. – 418 p.
- 87. Southgate, V. R. Observations on the epidermis of the miracidium and on the formation of the tegument of the sporocyst of *Fasciola hepatica* / V. R. Southgate // Parasitology. 1970. Vol. 61, N 2. P. 177–190.
- 88. Stiles, C. W. The Anatomy of the Large American Fluke (*Fasciola magna*) / C. W.Stiles// The Journal of comparative medicine and veterinary archives. – 1894. – Vol. 15, N 4. – P. 225.
- 89. Stunkard, H. W. The morphology and life-history of the digenetic trematode, *Azygia sebago* Ward, 1910 / H. W. Stunkard // The Biological Bulletin. 1956. Vol. 111, N 2. P. 248–268.
- 90. Swart, P. J. A study of the epidermal structures of the miracidia of *Calicophoron calicophorum* (Fischoeder, 1901) Nasmark, 1937 and *Paramphistomum microbothrium* (Fischoeder, 1901) / P. J. Swart // Onderstepoort Journal of Veterinary Research. 1967.
 Vol. 34. P. 1–15.
- 91. Świderski, Z. An ultrastructural study of the egg wall surrounding the miracidium of the digenean *Brandesia turgida* (Plagiorchiida: Pleurogenidae), with the description of a unique cocoon-like envelope / Z. Świderski, L. G. Poddubnaya, A. E. Zhokhov, J. Miquel, D. I. Gibson // Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology. 2013. Vol. 253, N 2. P. 114–118.
- 92. Świderski, Z. Ultrastructural studies on egg envelopes surrounding the miracidia of *Mediogonimus jourdanei* Mas-Coma et Rocamora, 1978 (Digenea, Microphalloidea, Prosthogonimidae) / Z. Świderski, A. Bakhoum, D. Młocicki, J. Miquel // Acta Parasitologica. 2010. Vol. 55, N 3. P. 245–253.
- 93. Taft, S. J. Some aspects of the larval development of *Cyclocoelum obscurum* (Trematoda: Cyclocoelidae) / S. J. Taft // The Journal of Parasitology. – 1973. – Vol. 59, N. 1. – P. 90–93.
- 94. Thomas, A. P. Memoirs: the life history of the liver-fluke (*Fasciola hepatica*) / A. P. Thomas // Journal of Cell Science. 1883. Vol. 2, N 89. P. 99–133.

- 95. Ullyott, P. The behaviour of *Dendrocoelum lacteum* / P. Ullyott // J. exp. Biol. 1936. Vol. 13. P. 253–278.
- 96. Ulmer, M. J. Postharmostomum helicis (Leidy, 1847) Robinson 1949 (Trematoda), Its Life History and a Revision of the Subfamily Brachylaeminae: Part I / M. J. Ulmer // Transactions of the American Microscopical Society. – 1951. – Vol. 70, N 3. – P. 189– 238.
- 97. Ulmer, M. J. Postharmostomum helicis (Leidy, 1847) Robinson 1949 (Trematoda), Its Life History and a Revision of the Subfamily Brachylaeminae: Part II / M. J. Ulmer // Transactions of the American Microscopical Society. – 1951. – Vol. 70, N 4. – P. 319– 347.
- 98. Vogel, H. Der Entwicklungs zyklus von Opisthorchis felineus (Riv.) nebst Bemerkungenii uber die Systematik und Epidemiologie. / H. Vogel// Zoologica. – 1934.
 – Vol. 86, N 1. – P. 1–103.
- 99. Walker, J. H. Experimental studies on trematodes belonging to the subfamily Reniferinae
 / J. H. Walker // Transactions of the American Microscopical Society. 1939. Vol. 58, N 4. – P. 404–430.
- 100. Wilson, R. A. Fine structure and organization of the musculature in the miracidium of *Fasciola hepatica* / R. A. Wilson // The Journal of Parasitology. 1969. Vol. 55, N 6. P. 1153–1161.
- 101. Wilson, R. A. Fine structure of the nervous system and specialized nerve endings in the miracidium of *Fasciola hepatica* / R. A. Wilson // Parasitology. 1970. Vol. 60, N 3. P. 399–410.
- 102. Wilson, R. A. Fine structure of the tegument of the miracidium of *Fasciola hepatica* L.
 / R. A. Wilson // The Journal of Parasitology. 1969. Vol. 55, N 1. P. 124–133.
- 103. Wilson, R. A. Gland cells and secretions in the miracidium of *Fasciola hepatica* / R. A.
 Wilson // Parasitology. 1971. Vol. 63, N 2. P. 225–231.
- 104. Wilson, R. A. The fine structure of the protonephridial system in the miracidium of *Fasciola hepatica* / R. A. Wilson // Parasitology. – 1969. – Vol. 59, N 2. – P. 461–467.
- 105. Wilson, R. A. The hatching mechanism of the egg of *Fasciola hepatica* L. / R. A. Wilson
 // Parasitology. 1968. Vol. 58, N 1. P. 79–89.

- 106. Woodhead, A. E. Life history studies on the trematode family Bucephalidae / A. E. Woodhead // Transactions of the American Microscopical Society. 1929. Vol. 48, N 3. P. 256–275.
- 107. Wootton, D. M. Notes on the life-cycle of *Azygia acuminata* Goldberger, 1911 (Azygiidae-Trematoda) / D. M. Wootton // The Biological Bulletin. 1957. Vol. 113, N 3. P. 488–498.
- 108. Wright, C. A. Flukes and snails/ C. A. Wright, London: *George Allen and Unwin* 1971. 579 p.
- 109. Yoshino, T. P. Mimicry of snail host antigens by miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni* / T. P. Yoshino, C. J. Bayne // Parasite immunology. 1983. Vol. 5, N 3. P. 317–328.

Список публикаций по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

Смирнов, П. А. Реконструкция строения мирацидия *Derogenes varicus* (Digenea: Derogenidae): первое ультраструктурное описание шипов на поверхности личинок Hemiurata. / П.А. Смирнов, Д.Ю. Крупенко // Паразитология. – 2023. – Т. 57, № 2. – Р. 108–123

Smirnov, P. A. Fine structure of a tiny gymnophalloid miracidium (Digenea) / P. A. Smirnov, A. A. Dobrovolskij // Journal of Morphology. – 2021. – Vol. 282, N 9. – P. 1374–1381.

Smirnov, P. A. Miracidium of *Steringophorus furciger* (Digenea: Fellodistomidae) and other passive Bucephalata larvae / P. A. Smirnov, A. Gonchar // Zoomorphology. – 2023. – Vol. 142, N 1. – P. 1–11.

Smirnov, P. A. What is hidden under an eggshell? Ultrastructural evidence on morphology of" passive" *Prosorhynchus squamatus* miracidium (Digenea: Bucephalidae) / P. A. Smirnov, A. A. Dobrovolski // Invertebrate Zoology. – 2019. – Vol. 16, N 4. – P. 361–376.

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

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