

УДК 576.895.121.21:591.46

**РЕКОНСТРУКЦИЯ СТРОЕНИЯ МИРАЦИДИИ
DEROGENES VARICUS (DIGENEA: DEROGENIDAE):
ПЕРВОЕ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЕ ОПИСАНИЕ ШИПОВ
НА ПОВЕРХНОСТИ ЛИЧИНОК *HEMIURATA***

© 2023 г. П. А. Смирнов* ^{a, b}, Д. Ю. Крупенко^b

^a Зоологический институт РАН,

Университетская наб., 1, Санкт-Петербург, 199034 Россия

^b Санкт-Петербургский государственный университет,

Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034 Россия

* e-mail: smirnov_pa@rambler.ru

Поступила в редакцию 03.03.2023 г.

После доработки 24.03.2023 г.

Принята к публикации 26.03.2023 г.

Мы провели детальную ультраструктурную реконструкцию «пассивного» мирацидия *Dero-genes varicus* Müller, 1784 – представителя гемиуратных дигеней. Мирацидий сильно миниатюризован и упрощен по сравнению с «активными» личинками. Впервые определена природа шипов личинок *Hemiurata*: они являются производными эпителиальных пластинок. Мирацидий несет на переднем конце три эпителиальные пластинки, снабженные и шипами, и ресничками. Большая часть покровов представлена тегументом. Нервная система упрощена до «минимального» состояния – обнаружен лишь один нейрон; выделительная система мирацидия полностью редуцирована, генеративный материал представлен единственной недифференцированной клеткой. Обсуждаются тенденции морфофункциональной эволюции мирацидиев *Hemiurata* в контексте их перехода к пассивной стратегии заражения первого промежуточного хозяина.

Ключевые слова: мирацидий, личинка, редукция, пассивная стратегия заражения, TEM, *Hemiuroidea*

DOI: 10.31857/S0031184723020023; **EDN:** AZWGWf

Hemiurata – один из крупнейших таксонов Digenea, монофилия которого подтверждается как морфологическими (Brooks et al., 1985), так и молекулярными (Olson et al., 2003) данными. Одним из синапоморфных признаков группы принято считать наличие шипов на поверхности мирацидиев (Gibson, Bray, 1979). Судя по многочисленным светооптическим описаниям личинок гемиурат, вооружение из шипов развито в разной степени у представителей группы. Мирацидий *Lecithaster salmonis* Yamaguti, 1934

полностью покрыт ресничками (Schell, 1975), никаких шипов на поверхности не выявлено. Большая часть покровов мирацидия *Genarchopsis goppo* Ozaki, 1925 также несет реснички, но передний конец снабжен вооружением из шипов (Madhavi, 1978). Похожая картина характерна для мирацидия *Hirudinella ventricosa*, однако в этом случае реснички покрывают только переднюю часть личинки, при этом передний конец несет шипы, радиально организованные в три группы по четыре шипа (Muruges, Madhavi, 1990). Описанная на ультраструктурном уровне личинка *Lecithochirium furcolabiatum* Jones, 1933 лишена шипов (Matthews, Matthews, 1991); ее покровы представлены четырьмя ресничными эпителиальными пластинками, окружающими передний конец. Во всех остальных светооптических описаниях мирацидиев *Hemiurata* авторы отмечают только шипы на поверхности: группы шипов многократно описываются в составе покровов мирацидиев *Azygiidae* (Schauinsland, 1883; Looss, 1894; Hussey, 1945; Stunkard, 1956; Wootton, 1957; Anderson, Anderson, 1963) и *Didymozoidae* (Baylis, 1938; Self et al., 1963). Для всех этих личинок характерно наличие шипов, покрывающих лишь отдельные участки тела. Наибольший уровень развития шипов на поверхности описан для мирацидия *Bunocotyle progenetica* Markowski, 1936 – эта личинка полностью покрыта упорядоченно расположенными шипами (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003).

Природа шипов на поверхности гемиуратных мирацидиев оставалась совершенно неясна. Некоторые исследователи вообще сомневались в самой трактовке поверхностных структур личинок *Hemiurata* как шипов, предполагая, что они могут оказаться «сложными структурами типа мембранелл *Ciliata*» (Семенов, 1991). Фактически неизвестны и детали внутреннего строения гемиуратных мирацидиев, поскольку эти личинки слишком малы для информативного светооптического исследования.

Ни в одном из светооптических описаний мирацидиев *Hemiurata* не говорится об активном выходе личинок из яиц в водную среду. Судя по всему, все гемиуратные мирацидии используют пассивную стратегию заражения первого промежуточного хозяина. Заражение происходит только после случайного проглатывания моллюском-хозяином инвазивного яйца. В пищеварительной системе моллюска мирацидии вылупляются и внедряются в его ткани через кишечный эпителий. Такая стратегия противопоставляется активной, при которой мирацидии выходят из яиц в воду, где за счет сложного поискового поведения достигают первого промежуточного хозяина.

Переход мирацидиев к пассивной стратегии заражения – тенденция, которая независимо реализуется в разных ветвях эволюции *Digenea*. Во всех случаях этот переход ассоциирован с экстремальной миниатюризацией личинок и глубокими структурными изменениями (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003; Smirnov, Gonchar, 2022). Очевидно, что не являются исключением и мирацидии *Hemiurata*, строение которых существенно отличается от всех описанных «активных» личинок. Отсутствие полноценного ультраструктурного описания гемиуратного мирацидия не позволяет предметно обсуждать природу преобразований, вызванных переходом к пассивной стратегии заражения в рамках таксона *Hemiurata*. Данное исследование – первая полная ультраструктурная реконструкция мирацидия *Hemiurata* – нацелено на восполнение этого пробела.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Сбор материала для данного исследования осуществлялся в полевой сезон 2017 г. в окрестностях УНБ «Беломорская» СПбГУ (<http://mbs.spbu.ru/ru/>). Мариты *Derogenes varicus* были получены при паразитологических вскрытиях трески (*Gadus morhua*). Все собранные мариты были помещены в раствор Рингера (для холоднокровных) для мацерации и получения яиц. В таком виде материал был доставлен в лабораторию кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ. В лаборатории была проведена оценка общего состояния и степени развития личинок в яйцах методами световой микроскопии с контрастом Номарского (Differential interference contrast) с использованием микроскопа Leica DM2500. На всех этапах материал хранился при 4°C. В процессе работы производился постоянный мониторинг состояния яиц с использованием микроскопа LeicaDM2500 с DIC. Зрелыми личинки признавались тогда, когда в течение двух недель с ними не происходило никаких заметных преобразований.

Яйца со зрелыми личинками были заморожены под высоким давлением с помощью станции криофиксации Leica EM HPM100. В качестве криопротектора использовался 20% раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA) на морской воде (20‰). Зафиксированные образцы хранились в жидком азоте при температуре -120°C. Криозамещение осуществлялось в станции Leica EM AFS2. В качестве фиксирующего «коктейля» использовался 1% раствор OsO₄ + 0.5% уранил ацетата на безводном ацетоне. Полученные образцы были проведены через смеси ацетона со средой для заключения Epon 812 с возрастающей концентрацией последней с увеличенными сроками. Все этапы пробоподготовки к ТЕМ-исследованию производились на базе ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» (<http://biomed.spbu.ru/>). С заключенных в блоки личинок на ультратоме Leica UC6 были получены серии ультратонких срезов. Изготовление серий осуществлялось следующим образом: 1) с заточенного участка блока, содержащего личинок, получались серии срезов толщиной 60 нм, 2) после получения такой серии с блока «срезалось» 2–3 полутонких среза толщиной 200–250 нм, 3) затем процедура повторялась. Такая методика позволила получить прерывистые серии срезов личинок в разных проекциях. Полученные серии были исследованы с помощью электронного микроскопа FEI Morgagni268 (80kV) в центре коллективного пользования «Таксон» Зоологического института РАН (<https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3038/>). Фотографии были обработаны с использованием графического редактора Adobe Photoshop. По полученным фотографиям срезов пяти личинок была выполнена схема-реконструкция мирацидия. Рисунки были оформлены в графическом редакторе CorelDRAW.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Светооптические наблюдения

Мирацидий *Derogenes varicus* Müller, 1784 заключен в эллипсоидное яйцо с толстыми стенками. На одном из полюсов четко выражена крышечка. Стенки яйца плохо пропускают свет, что говорит о высокой степени задубленности белков, образующих 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 на рис. 1. Схема покровов представлена на рис. 2.

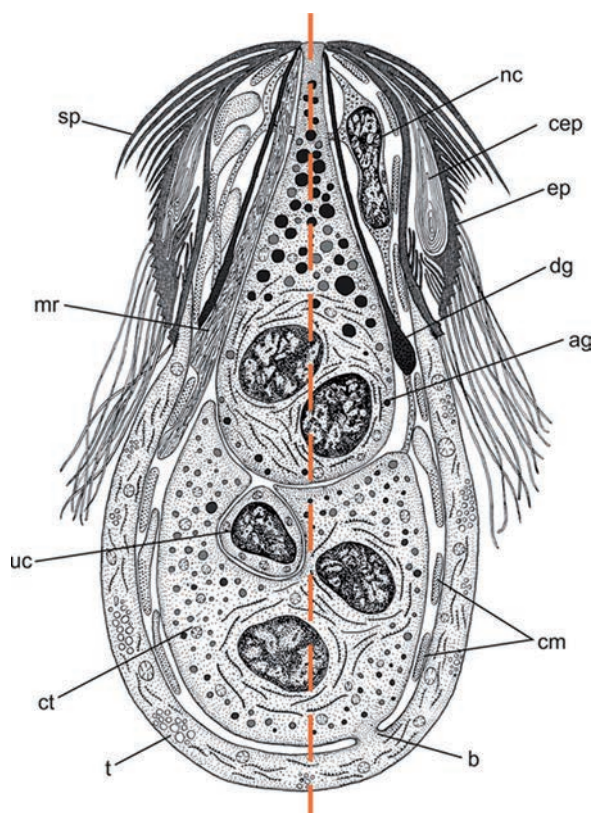


Рисунок 1. Схема-реконструкция мирацидия *Derogenes varicus*: ag – апикальная железа, b – цитоплазматический мостик (связывающий ct и t), cep – ребро эпителиальной пластинки, cm – кольцевые мышечные клетки, ct – цитон тегумента, dg – «темная» железа, ep – эпителиальная пластинка, mr – мышечная клетка-ретрактор хоботка, nc – нейрон, sp – шипы, t – пластинка тегумента, uc – недифференцированная клетка. Схема выполнена таким образом, что ее левая и правая части являются срезами через радиусы, обусловленные расположением эпителиальных пластинок.

Figure 1. Reconstruction of *Derogenes varicus* miracidium. Abbreviations: ag – apical gland, b – cytoplasmic bridge (between ct and t), cep – core of epithelial plate, cm – circular muscle cell, ct – tegumental cyton, dg – “dark” gland, ep – epithelial plate, mr – retractor muscle cell, nc – nerve cell, sp – spines, t – tegument, uc – undifferentiated cell.

*The scheme is constructed in the way that its left and right sides are sections through the radii determined by the position of the epithelial plates.

Ультраструктурные данные

Покровы

Покровы мирацидия *D. varicus* представлены тегументом, к которому крепятся три эпителиальные пластинки (рис. 2), расположенные радиально-симметрично на передней трети тела личинки (рис. 3; 5a). Пластинки треугольные, характеризуются очень своеобразным строением: наряду с развитым ресничным аппаратом, занимающим задние участки поверхности клеток (рис. 3d), на передних концах пластинок располагаются шипы (рис. 3a, 3b). Ультраструктура этих шипов в общих чертах соответствует структуре 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 (рис. 3b). Каждая эпителиальная пластинка несет два продольных ряда таких шипов, расположенных по бокам от медиальной линии (рис. 2). В каждом ряду находится не менее десяти направленных назад шипов, расположенных по размерному градиенту таким образом, что передние оказываются самыми длинными (2–3 мкм), а задние – самыми короткими (<1 мкм). Медиальная зона клетки несет сильно скрученный «клубок» из двух мембран (рис. 3c, 3d) – ребро эпителиальной пластинки. Этот мембранный комплекс имеет форму конуса, 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 (рис. 3a). 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 (рис. 1). Реснички классического строения расположены на поверхности задней части эпителиальной пластинки продольными рядами (двумя группами по бокам от медиальной линии пластинки), немногочисленны (рис. 2). Основание каждой реснички окружено небольшой кольцевой складкой поверхностной мембраны пластинки (рис. 3d). От базального тельца реснички отходит сильно редуцированный единственный корешок. Цитоплазма эпителиальных пластинок слабо развита, заполнена неким электронно-плотным зернистым веществом, характеризуется наличием небольшого числа митохондрий, а также вакуолей неправильной формы. Края эпителиальных пластинок связаны с тегументом при помощи десмосом (рис. 3c). Под базальной мембраной участков клеток, не соприкасающихся с тегументом, можно наблюдать хорошо выраженную базальную пластинку (рис. 3c). Базальная пластинка также выражена и под тегументом. Как было отмечено выше, передний конец тела личинки способен вворачиваться – на срезах удалось наблюдать личинок как с ввернутым (рис. 5a), так и с вывернутым (рис. 3a) «интровертом».

Тегумент личинки *D. varicus* характеризуется разной толщиной на разных участках тела. Он может быть представлен в виде узкой полоски, фактически лишенной цитоплазмы, но может и достигать существенной толщины (1.5–2 мкм). На тех участках, где тегумент хорошо выражен, он представляет собой синцитиальную пластинку, богатую органоидами и гранулами гликоген-подобного полисахарида (рис. 3а). Здесь имеются крупные митохондрии, развитый шероховатый эндоплазматический ретикулум (ШЭПР), свободные рибосомы, а также множество вакуолей. Последние часто оказываются сгруппированными, что создает впечатление «пенистости» тегумента. Все это, очевидно, говорит о высокой степени активности тегумента. Погруженная часть тегумента представлена единственным цитоном, занимающим около половины объема мирацидия (рис. 4а). Узкий цитоплазматический мостик, расположенный на заднем участке тела личинки (рис. 4б), связывает синцитиальную пластинку с цитоном. Клеточное тело несет два активных ядра (рис. 4а), окруженных развитым ШЭПР. Цитоплазма цитона, значительно отличаясь от цитоплазмы пластинки, содержит большое число сферических секреторных гранул разной степени зрелости.

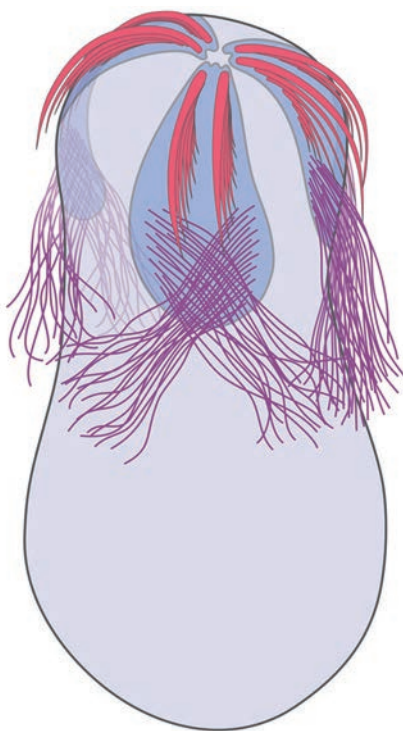


Рисунок 2. Схема покровов мирацидия *Derogenes varicus*.

Figure 2. Scheme of the surface of *Derogenes varicus* miracidium.

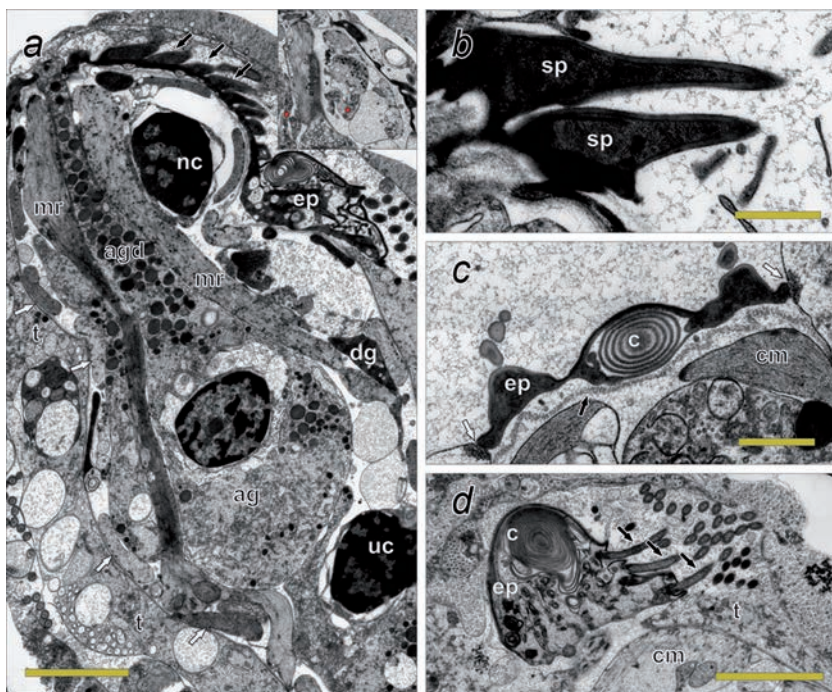


Рисунок 3. Электронограммы срезов мирацидия *Derogenes varicus* I.

a – срез через переднюю половину мирацидия (черные стрелки указывают на шипы, белые – на кольцевые мышечные клетки), масштабная линейка: 2 мкм, в рамку вынесен фрагмент среза из той же серии, демонстрирующий нервные отростки (отмечены звездочкой), *b* – срез через шипы мирацидия. Масштабная линейка: 0.5 мкм, *c* – поперечный срез через переднюю треть эпителиальной пластинки (черная стрелка указывает на базальную пластинку, белые стрелки – на десмосомы), масштабная линейка: 0.5 мкм, *d* – косой срез через заднюю треть эпителиальной пластинки (черные стрелки указывают на реснички), масштабная линейка: 2 мкм.

Сокращения: ag – апикальная железа, agd – проток апикальной железы, c – ребро эпителиальной пластинки, cm – кольцевые мышечные клетки, dg – «темная» железа, ep – эпителиальная пластинка, mr – мышечная клетка-ретрактор хоботка, nc – нервная клетка, sp – шипы, t – пластинка тегумента, uc – недифференцированная клетка.

Figure 3. Micrographs of the sections through *Derogenes varicus* miracidium I.

a – section through the anterior half of the miracidium, (black arrows point spines, white arrows – circular muscle cells), scalebar: 2 μm, box contains section from the same series that demonstrate neural processes marked with asterisk,

b – section through the spines of the miracidium, scalebar: 0.5 μm, *c* – transverse section through the anterior third of the epithelial plate (black arrows point basal lamina, white arrows – desmosomes), scalebar: 0.5 μm, *d* – oblique section through the posterior third of the epithelial plate (black arrows point cilia), scalebar: 2 μm.

Abbreviations: ag – apical gland, agd – apical gland duct, c – core of epithelial plate, cm – circular muscle cell, dg – “dark” gland, ep – epithelial plate, mr – retractor muscle cell, nc – nerve cell, sp – spines, t – tegument, uc – undifferentiated cell.

Мускулатура

Мускулатура мирацидия *D. varicus* представлена не менее чем восьмью кольцевыми клетками и двумя продольными (рис. 3а). Кольцевые клетки содержат неупорядочно 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 (рис. 3а). 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, а также между 5-м и 6-м кольцами мускулатуры. 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 (рис. 4с).

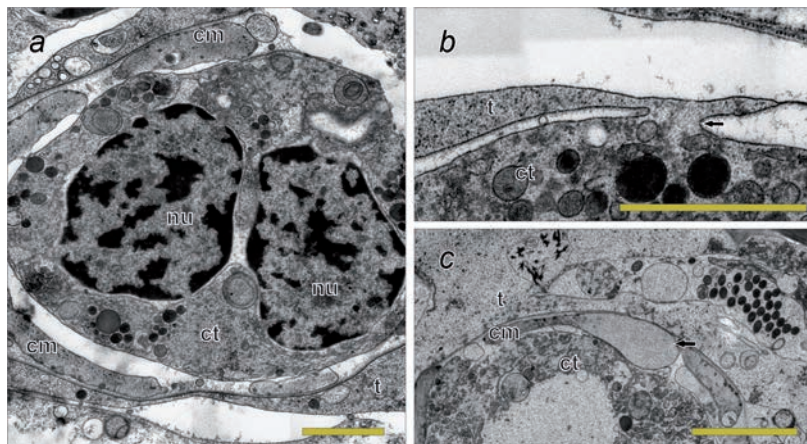


Рисунок 4. Электронограммы срезов мирацидия *Derogenes varicus* II.

a – продольный срез через цитон тегумента, масштабная линейка: 1 мкм, *b* – срез через мостик, соединяющий цитон и пластинку тегумента (черная стрелка), масштабная линейка: 1 мкм, *c* – срез через стенку тела, демонстрирующий отросток мышечной клетки (черная стрелка), масштабная линейка: 2 мкм.

Сокращения: *cm* – кольцевые мышечные клетки, *ct* – цитон тегумента, *nu* – ядра цитона тегумента, *t* – пластинка тегумента.

Figure 4. Micrographs of the sections through *Derogenes varicus* miracidium II.

a – longitudinal section through cyton of tegument of the miracidium, scalebar: 1 μ m, *b* – section through the cytoplasmic bridge connecting cyton and tegument of the miracidium, scalebar: 1 μ m, *c* – section through body wall that demonstrates the extending of circular muscle cell of the epithelial plate (black arrows point basal lamina, white arrows – desmosomes), scalebar: 2 μ m,

Abbreviations: *cm* – circular muscle cell, *ct* – cyton of tegument, *nu* – nuclei of cyton of tegument, *t* – tegument.

Аппарат проникновения

Аппарат проникновения представлен двумя типами желез. Обширная двужадерная апикальная железа грушевидной формы занимает переднюю половину тела личинки (рис. 3а). В ней можно наблюдать хорошо развитый белоксинтезирующий аппарат, представленный ШЭПР. В цитоплазме железы проникновения накоплены зрелые гранулы секрета. Гранулы сферические, равномерно заполнены электронно-плотным содержимым. Апекс железы связан с эпителиальными пластинками десмосомами. Хорошо выражен проток железы, армированный цитоскелетом из микротрубочек. Железы второго типа представлены двумя «темными» клетками (рис. 5б). Темные железы расположены в передней половине тела, по бокам от железы проникновения. Эти 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.

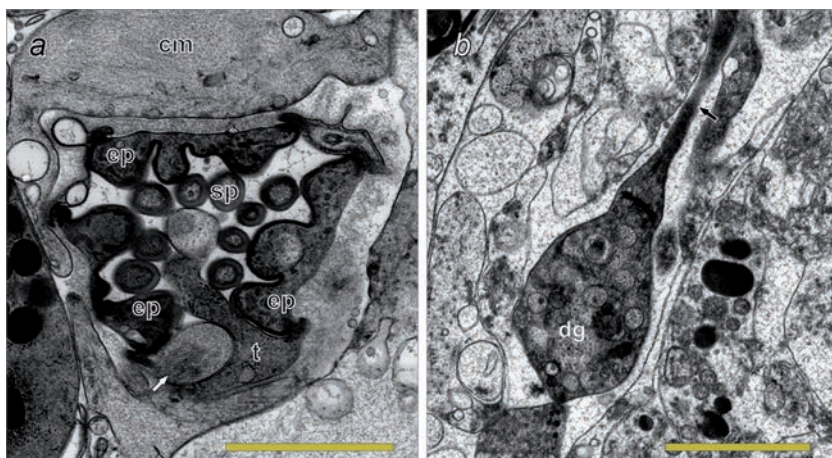


Рисунок 5. Электронограммы срезов мирацидия *Derogenes varicus* III.

a – поперечный срез через свернутый передний конец (белая стрелка указывает на сенсорное окончание), масштабная линейка: 1 мкм, *b* – срез через «темную» железу (черная стрелка указывает на проток железы), масштабная линейка: 1 мкм.

Сокращения: *cm* – кольцевые мышечные клетки, *dg* – «темная» железа, *ep* – эпителиальная пластинка, *sp* – шипы, *t* – пластинка тегумента.

Figure 5. Micrographs of the sections through *Derogenes varicus* miracidium III.

a – section through the inverted anterior end of the miracidium, (white arrow points sensory ending), scalebar: 1 μm, *b* – section through “dark” gland of the miracidium (black arrow points gland duct), scalebar: 1 μm,

Abbreviations: *cm* – circular muscle cell, *dg* – “dark” gland, *ep* – epithelial plate, *sp* – spines, *t* – tegument.

Нервная система

В теле мирацидия *D. varicus* удалось обнаружить единственную нервную клетку (рис. 3а), 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. Структура, трактуемая нами как сенсилла, приурочена к тегументу (рис. 5а), несет пучок неупорядоченных микротрубочек; клеточный контакт, связывающий сенсиллу с синцитиальной пластинкой, на срезы не попал. Цитоплазма всех элементов нервной системы, которые удалось наблюдать, характеризуется наличием микровезикул с нейромедиатором.

Выделительная система

Специализированная выделительная система у мирацидия *D. varicus* отсутствует.

Генеративный материал

Генеративный материал представлен в теле личинки одной недифференцированной клеткой, расположенной в середине тела. Будучи «зажатой» между железой проникновения и цитомом тегумента, недифференцированная клетка оказывается слегка вдавленной в последний. Ядро этой клетки богато гетерохроматином, в цитоплазме лежит множество свободных рибосом (рис. 6).

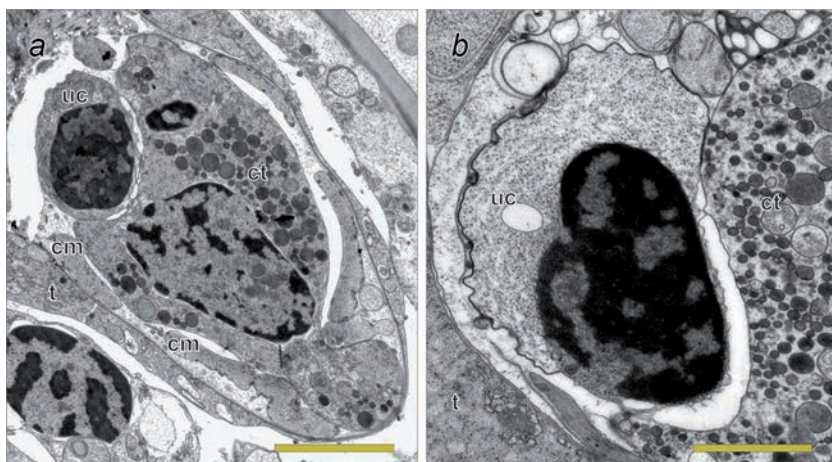


Рисунок 6. Электронограммы срезов мирацидия *Derogenes varicus* IV.

a – срез через задний конец, масштабная линейка: 2 мкм, *b* – недифференцированная клетка, масштабная линейка: 1 мкм.

Сокращения: см – кольцевые мышечные клетки, ct – цитон тегумента, t – пластинка тегумента, uc – недифференцированная клетка.

Figure 6. Micrographs of the sections through *Derogenes varicus* miracidium IV.

a – section through the posterior end of the miracidium, scalebar: 2 μ m, *b* – section through undifferentiated cell, scalebar: 1 μ m.

Abbreviations: cm – circular muscle cell, ct – cyton of tegument, t – tegument, uc – undifferentiated cell.

Переход к пассивной стратегии заражения первого промежуточного хозяина повлек за собой существенные изменения в строении мирацидиев *Hemiurata*. Исследованная нами личинка *D. varicus* – чрезвычайно миниатюризована и упрощена по сравнению с любым описанным «активным» мирацидием (Wilson, 1969a, 1969b, 1969c, 1970, 1971; Pan, 1980; Тихомиров, 2000). Смена стратегии заражения, включающая смену среды, в которой мирацидий активен (с водной среды на среду содержимого кишки моллюска), полностью изменила функциональную нагрузку на все клеточные системы – вероятно, это и послужило причиной столь резких и глубоких структурных модификаций.

Ранее нами было высказано предположение о несоответствии ресничного способа локомоции мирацидиев условиям вязкого слизистого содержимого кишечника моллюска (Smirnov, Gonchar, 2022). Преобразования покровов мирацидиев *Hemiurata* полностью подтверждают этот тезис. Мы полагаем, что наблюдаемое разнообразие организации покровов у гемиуратных личинок отражает этапы редукции ресничного покрова и его замещения шипами. Мирацидий *Lecithaster salmonis* характеризуется полноценно развитым ресничным покровом (Schell, 1975). В этом контексте предположение Семенова (1991) о цирриподобной природе «шипов» личинок гемиурат выглядит вполне логичным, ведь материал для формирования таких структур имеется у некоторых личинок. Вероятно, собранные в пучки реснички действительно позволили бы мирацидиям более успешно перемещаться в вязком содержимом кишки (таковой способ передвижения по субстрату известен для ряда инфузорий). С другой стороны, описание личинки *Lecithochirium furcolabiatum* (Matthews, Matthews, 1991) демонстрирует схему покровов, преимущественно лишенных ресничек. И пусть авторы не решились описывать эти покровы как тегумент, в который впаяны несущие реснички эпителиальные пластинки, – такая трактовка, безусловно, напрашивается. Исходя из этого, логично было бы предположить, что наблюдаемые у гемиуратных мирацидиев шипы могли бы являться классическими для *Neodermata* шипами тегумента. Мирацидий *D. varicus*, описываемый в данной работе, оказался весьма удачным объектом для проверки этих двух гипотез. Организация покровов личинки *D. varicus* во многом напоминает строение покровов мирацидия *L. furcolabiatum*. Здесь мы также наблюдаем отдельные эпителиальные пластинки, располагающиеся в передней части личинки. Однако, эти пластинки несут и реснички, и шипы. Очевидно, что шипы используются личинкой для проникновения через кишечный эпителий. Механизм этого проникновения несложно представить, если учесть, что передняя часть личинки способна выворачиваться. Выворачивание этого участка сопровождается выбросом вооружения из шипов – так, вероятно, личинка способна «пробить» эпителий кишки. Самыми эффективными в этом процессе, конечно же, являются передние

шпиы (самые длинные). В таком случае не столь удивительным кажется то, что шпиы формируются именно на поверхности эпителиальных пластинок, а не на тегументе, который составляет бо́льшую часть покровов личинки. Необычное место расположения шпиов можно объяснить тем, что после проникновения мирацидия в стенку кишечника моллюска-хозяина эти структуры полностью теряют функциональную нагрузку. Сбрасывая эпителиальные пластинки в процессе проникновения, мирацидий *D. varicus* избавляется и от шпиов, которые уже сыграли свою роль. Важно отметить, что эпителиальные пластинки приобрели новую для подобных клеток функцию, фактически став элементом аппарата проникновения. Об этом свидетельствуют чуть ли не все детали их строения. Описанный мембранный клубок в средней части пластинки скорее всего выполняет функцию ребра жёсткости, что, очевидно, увеличивает эффективность проникновения. Открытым остается вопрос о возможности выполнения локомоторной функции подобными эпителиальными пластинками. Мы склонны трактовать ресничный аппарат пластинок мирацидия *D. varicus* как своеобразный рудимент. Во-первых, ресничек на поверхности этих клеток не так уж и много – их явно недостаточно для локомоции целого организма в слизистом содержимом кишки. Во-вторых, корешковый аппарат этих ресничек значительно редуцирован. В-третьих, для большинства мирацидиев *Hemiarata* реснички на поверхности не описаны вовсе, что также намекает на «остаточную» природу ресничек у *D. varicus*.

Определив общую схему строения покровов и природу шпиов на примере *D. varicus*, мы можем вкладывать новый смысл в старые схемы по некоторым другим мирацидиям *Hemiarata*. Так, личинка *Proterometra dickermanni*, описанная Андерсонами (Anderson, Anderson, 1963), характеризуется покровами, схожими с покровами *D. varicus*. Пять эпителиальных пластинок, расположенных вокруг апекса этой личинки, по-видимому, несут настоящие шпиы, которые авторы обозначают как «щетинки». Возможно, похожая организация наблюдается и у личинок семейства *Hirudinellidae* (Muruges, Madhavi, 1990). А вот такие мирацидии, каких описывают для *Halipegus amherstensis* (Ranking, 1944), *Nematobothrium texomensis* (Self et al., 1963) или *Bunocotyle progenetica* (Galaktionov, Dobrovolskij, 2003), демонстрируют несколько иную схему. Вся поверхность таких личинок или бо́льшая ее часть покрыта шпиами. Скорее всего, и эти шпиы являются элементами эпителиальных пластинок. Последние, покрывая практически все тело мирацидия, в данном случае оказались полностью лишены ресничек. Таким образом, для некоторых личинок *Hemiarata* характерны редукция эпителиальных пластинок и их концентрация на переднем конце, для других характерно наличие полноценно развитых «шипастых» пластинок, покрывающих бо́льшую часть тела.

Открытым остается вопрос о возможности локомоции мирацидия *D. varicus* в кишке моллюска. Как было сказано выше, эффективное использование ресничек выглядит сомнительным. Мы полагаем, что организация мускулатуры у личинки

D. varicus позволяет личинке осуществлять только один тип движения: вворачивание/выворачивание переднего конца. Возможно, что работа переднего конца как интроверта позволяет мирацидию перемещаться, но столь же вероятно, что личинка использует этот тип движения исключительно для проникновения в кишечный эпителий. Не исключено, что возле поверхности кишки личинка оказывается в результате пассивного перемещения вместе с остальным содержимым кишки.

Общий уровень редукции клеточных систем мирацидия *D. varicus* сопоставим с тем, что наблюдается у других «пассивных» мирацидиев (Smirnov, Dobrovolskij, 2019, 2021; Smirnov, Gonchar, 2022). Экстремальная редукция нервной системы, безусловно, связана с отсутствием необходимости поиска первого промежуточного хозяина. Вопрос о том, как именно осуществляется работа таких простых нервных систем, какие мы наблюдаем у пассивных личинок требует дополнительных исследований. Тем не менее, очевидно, что ситуация, при которой всего один нейрон обеспечивают работу всей мускулатуры организма, накладывает определенные ограничения на иннервацию. Судя по всему, редукция нервной системы пассивных личинок влечет за собой компактизацию нейромышечного взаимодействия. Вероятно, единичной нервной клетке *D. varicus* оказывается затруднительно связаться со всеми элементами мускулатуры. Отростки мышечных клеток, которые мы наблюдаем у мирацидия *D. varicus*, видимо, снимают эту задачу с нейронов и самостоятельно тянутся к последним. Похожую картину мы наблюдали у «пассивного» мирацидия *Parvatrema affine* (Smirnov, Dobrovolskij, 2021). Вполне вероятно, что эти отростки гомологичны перикарионам (миоцитонам) мышечных клеток «активных» личинок, но в случае *D. varicus* ядра редуцированы, и в отростках не наблюдается ничего, кроме митохондрий и гранул гликогена. Видимо, отростки сохраняют функцию запасаания питательных веществ для работы мускулатуры.

Судя по всему, тенденция к редукции выделительной системы является общей для «пассивных» мирацидиев (Smirnov, Gonchar, 2022). Вероятно, характерный для них пассивный образ жизни не сопровождается накоплением критической концентрации метаболитов, что делает возможной полную редукцию протонефридиев. Осморегуляторные потребности «пассивных» мирацидиев крайне сложно определить, но отсутствие специализированной выделительной системы и у личинки *D. varicus*, и у некоторых ранее описанных «пассивных» личинок (Smirnov, Dobrovolskij, 2021; Smirnov, Gonchar, 2022) позволяет утверждать, что эти потребности невелики.

Фактически все системы мирацидия *D. varicus* можно считать редуцированными по сравнению с «активными» личинками. Все, за исключением аппарата проникновения. Строение личинки демонстрирует, что проникновение в ткани моллюска – главная (если не единственная) функция личинки. Как было сказано выше, важную роль в этом процессе играют эпителиальные пластинки. Столь же значимыми элементами, вероятно, являются железы, занимающие переднюю половину тела.

Не исключено, что и снабженный развитым секрет-продуцирующим аппаратом цитон тегумента, занимающий большую часть задней половины личинки также участвует в проникновении или миграции мирацидия в тканях моллюска-хозяина. Разнообразие элементов аппарата проникновения может указывать на «сложность» процесса проникновения через кишечный эпителий.

Очевидно, что после метаморфоза мирацидия *D. varicus* материнская спороциста будет развиваться – эта стадия полноценно развита у гемиурат (Madhavi, 1978) и представлена крупным подвижным червеобразным организмом. Это означает, что в мирацидии заложен потенциал для развития соматических элементов. Как и в ранее описанных нами случаях (Smirnov, Dobrovolskij, 2019, 2021; Smirnov, Gonchar, 2022), мы полагаем, что этот потенциал реализуется за счет деления недифференцированной клетки и последующей специализации ее потомков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Смена стратегии заражения первого промежуточного хозяина повлекла за собой существенные преобразования в строении мирацидиев *Hemiurata*, что ясно и из многочисленных светооптических схем, и из приводимых нами данных по *D. varicus*. Мирацидий *D. varicus* – сильно миниатюризованный организм, сложенный из малого числа клеточных элементов. Главная функция мирацидия – проникновение в кишечный эпителий моллюска-хозяина. Клеточные элементы, не являющиеся необходимыми для выполнения этой функции, подверглись редукции. Важной тенденцией эволюции мирацидиев *Hemiurata* следует считать появление шипов и дальнейшее замещение ими ресничек на поверхности эпителиальных пластинок. Очевидно, что шипы служат для внедрения мирацидия в кишечный эпителий. Не исключено, что шипы могут увеличивать эффективность движения мирацидия в химусе кишки у некоторых представителей *Hemiurata*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена в рамках государственной академической программы 1021051402849-1 (AAAA-A19-119020690109-2).

Авторы выражают благодарность К.В. Галактионову за комментарии и редактуру текста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Семёнов О.Ю. 1991. Мирацидии: строение, биология, взаимодействие моллюсками. Тр. ЛОЕ 83 (4): 203 с. [Semenov O.Y. 1991. Miracidia: structure, biology, inter-relationships with molluscs. Tr. LOE 83 (4): 203 pp. (in Russian)].
- Тихомиров И.А. 2000. Микроанатомия мирацидия *Philophthalmus rhionica* (Trematoda: Philophthalmidae). Паразитология 34 (3): 210–221. [Tikhomirov I.A. 2000. Microanatomy of *Philophthalmus rhionica* miracidium (Trematoda: Philophthalmidae). Parasitologiya 34 (3): 210–221. (in Russian)].
- Anderson M.G., Anderson F.M. 1963. Life history of *Proterometra dickermani* Anderson, 1962. The Journal of Parasitology 49 (2): 275–280. <https://doi.org/10.2307/3275994>

- Baylis H.A. 1938. On two species of the trematode genus *Didymozoon* from the mackerel. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 22 (2): 485–492. <https://doi.org/10.1017/S0025315400012388>
- Brooks D.R., O'Grady R.T., Glen D.R. 1985. Phylogenetic analysis of the Digenea (Platyhelminthes: Cercomeria) with comments on their adaptive radiation. *Canadian Journal of Zoology* 63 (2): 411–443.
- Galaktionov K.V., Dobrovolskij A.A. 2003. The biology and evolution of trematodes: an essay on the biology, morphology, life cycles, transmissions, and evolution of digenetic trematodes. Springer Science & Business Media.
- Gibson D.I., Bray R.A. 1979. The Hemiuroidea: terminology, systematics and evolution. *Bulletin of the British Museum* 36: 35–146. <https://doi.org/10.5962/bhl.part.3604>
- Hussey K.L. 1945. The miracidium of *Proterometra macrostoma* (Faust) Horsfall 1933. *The Journal of Parasitology* 31 (4): 269–271.
- Looss A. 1894. Die Distomen unserer Fische und Frösche: Neue Untersuchungen über Bau und Entwicklung des Distomenkörpers. *Bibliotheca Zoologica* 6 (16): 1–296.
- Madhavi R. 1978. Life history of *Genarchopsis goppo* Ozaki, 1925 (Trematoda: Hemiuriidae) from the freshwater fish *Channa punctata*. *Journal of Helminthology* 52 (3): 251–259. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00005459>
- Matthews B.F., Matthews R.A. 1991. *Lecithochirium furcolabiatum* (Jones, 1933), Dawes 1947: The miracidium and mother sporocyst. *Journal of Helminthology* 65 (4): 259–269. <https://doi.org/10.1017/S0022149X0001083X>
- Muruges M., Madhavi R. 1990. Egg and miracidium of *Hirudinella ventricosa* (Trematoda: Hirudinellidae). *The Journal of Parasitology* 76 (5): 748–749. <https://doi.org/10.2307/3282998>
- Olson P.D., Cribb T.H., Tkach V.V., Bray R.A., Littlewood D.T.J. 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) 1. *International Journal for Parasitology* 33 (7): 733–755. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00049-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00049-3)
- Pan C.T. 1980. The fine structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 36 (3): 307–372. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(80\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(80)90040-3)
- Ranking J.S. 1944. A review of the trematode genus *Halipegus* Looss, 1899, with an account of the life history of *H. amherstensis* n. sp. *Transactions of the American Microscopical Society* 63(2): 149–164. <https://doi.org/10.2307/3223157>
- Schauinsland H. 1883. Beitrag zur Kenntniss der Embryonalentwicklung der Trematoden. Gustav Fischer.
- Schell S.C. 1975. The miracidium of *Lecithaster salmons* Yamaguti, 1934 (Trematoda: Hemiuroidea). *The Journal of Parasitology* 61 (3): 562–563. <https://doi.org/10.2307/3279350>
- Self J.T., Peters L.E., Davis C.E. 1963. The egg, miracidium, and adult of *Nematobothrium texomensis* (Trematoda: Digenea). *The Journal of Parasitology* 49 (5): 731–736. <https://doi.org/10.2307/3275914>
- Smirnov P.A., Gonchar A. 2022. Miracidium of *Steringophorus furciger* (Digenea: Fellodistomidae) and other passive Bucephalata larvae. *Zoomorphology* 142: 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00435-022-00580-6>
- Smirnov P.A., Dobrovolskij A.A. 2019. What is hidden under an eggshell? Ultrastructural evidence on morphology of “passive” *Prosorhynchus squamatus* miracidium (Digenea: Bucephalidae). *Invertebrate Zoology* 16(4): 361–376. <https://doi.org/10.15298/invertzool.16.4.04>
- Smirnov P.A., Dobrovolskij A.A. 2021. Fine structure of a tiny gymnophalloid miracidium (Digenea). *Journal of Morphology* 282(9): 1374–1381. <https://doi.org/10.1002/jmor.21392>
- Stunkard H.W. 1956. The morphology and life-history of the digenetic trematode, *Azygia sebae* Ward, 1910. *The Biological Bulletin* 111 (2): 248–268. <https://doi.org/10.2307/1539017>
- Wilson R.A. 1969a. Fine structure of the tegument of the miracidium of *Fasciola hepatica* L. *The Journal of Parasitology* 55 (1): 124–133. <https://doi.org/10.2307/3277361>
- Wilson R.A. 1969b. Fine structure and organization of the musculature in the miracidium of *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology* 55 (6): 1153–1161. <https://doi.org/10.2307/3277247>

- Wilson R.A. 1969c. The fine structure of the protonephridial system in the miracidium of *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 59 (2): 461–467. <https://doi.org/10.1017/s003118200008241x>
- Wilson R.A. 1970. Fine structure of the nervous system and specialized nerve endings in the miracidium of *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 60 (3): 399–410. <https://doi.org/10.1017/S0031182000078197>
- Wilson R.A. 1971. Gland cells and secretions in the miracidium of *Fasciola hepatica*. *Parasitology* 63 (2): 225–231. <https://doi.org/10.1017/S0031182000079543>
- Wootton D.M. 1957. Notes on the life-cycle of *Azygia acuminata* Goldberger, 1911 (Azygiidae-Trematoda). *The Biological Bulletin* 113 (3): 488–498. <https://doi.org/10.2307/1539078>

RECONSTRUCTION OF *DEROGENES VARICUS* MIRACIDIUM (DIGENEA: DEROGENIDAE): FIRST ULTRASTRUCTURAL DESCRIPTION OF SPINES ON THE SURFACE OF HEMIURATA LARVAE.

Peter A. Smirnov, D. Y. Krupenko

Keywords: Miracidium, Larva, TEM, Digenea, Hemiuroidea, Derogenidae

SUMMARY

We performed the detailed ultrastructural reconstruction of the “passive” miracidium of *Derogenes varicus* – the species from Hemiurata group. The miracidium is highly miniaturized and simplified in comparison with the “active” miracidia. For the first time we elucidate the nature of the spines on the surface of hemiuroid larva: they are derivatives of the epithelial plates. The anterior end of the larva is equipped with three epithelial plates, that bear both spines and cilia. The major part of the miracidial surface is formed by tegument. The nervous and excretory systems of the *D. varicus* miracidium are extremely reduced. Single undifferentiated cell comprises the germinal material of the miracidium. We discuss the trends of evolution of hemiuroid miracidia that are associated with transition to passive strategy of infection.