

Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН

Лаборатория сравнительной этологии и биокommunikации

Московская школа на Юго-Западе № 1543

Классификация гемогрегарин (Adeleorina, Apicomplexa) скальных ящериц (*Darevskia*,
Lacertidae, Squamata) по морфологическим признакам

Ф.О. Кохаров

М.Р. Яворский

Научные руководители:

Э.О. Галоян

О.Д. Николаев

Москва 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

Оглавление.....	2
Введение.....	2
Литобзор.....	10
Материалы и Методы.....	10
Результаты.....	1
5	
Обсуждение.....	24
Список литературы.....	25

ВВЕДЕНИЕ

Род скальные ящерицы (*Darevskia*) включает 42 вида, из которых 7 - партеногенетические (Uetz and Nošek, 2019). Скальные ящерицы распространены на Кавказе, Балканах, в Крыму, Иране, Турции, Азербайджане (Arribas, 1999). Это животные с уплощенным телом длиной 45-85мм, хвостом, превышающим длину тела примерно в два раза, сравнительно длинными ногами, на ступнях которых есть специальные мозоли, чтобы лучше цепляться за камни. Цвет спинных чешуй скальных ящериц может быть любым от темного бурого-серого до зеленого. (Даревский, 1967) Скальные ящерицы часто заражены паразитическими клещами (Orlova et. al., 2022) – переносчиками внутриклеточных паразитов из подотряда Adeleorina типа Apicomplexa (гемогрегарин) (Damas-Moreira et. al., 2013) и собственно гемогрегаринами. (Beyer; Arakelyan; Harutyunyan; Orlova) Жизненный цикл гемогрегарин (*Haemogregarina*) проходит как минимум в двух хозяевах: промежуточном (позвоночное) и окончательном (членистоногое) (Baneth et. al., 2007, Van As et. al., 2025). Обычно у рептилий промежуточных хозяев два: хищник и его добыча (Damas-Moreira et al., 2013).

Гемогрегарины – внутриклеточные паразиты. Спорозоиты обычно заражают гепатоциты, а мерозоиты – эритроциты, где развиваются гамонты (Smith, 1996). Спорозоиты также были обнаружены в семенниках скальных ящериц (Beyer) а гамонты в лейкоцитах птиц (Van As et. al., 2020) и львов (Van As et. al., 2025). Гамонтов внутри эритроцитов окружает

паразитиформная вакуоль (PV), которую затем микромерозоиты изменяют, чтобы создать комфортную среду для развития паразита (Beyer et. al., 2002, Van As et. al., 2015).

Заражение гемогрегаринами редко приводит к смерти их промежуточных хозяев (Manwell 1977; Bouma et al. 2007), однако заражение видами, не естественными для хозяев, приводит к сильному лейкоцитозу и смерти менее чем за 100 дней (Wozniak et. al., 1996). При заражении хозяина видами, приспособленными к нему, может снижаться способность регенерации хвоста (Oppliger et al., 1996), скорость реакции, сила укуса и дистанция спугивания (Damas-Moreira et al., 2013).

Выделяют 5 (Beyer, 1968) или 6 (Harutyunyan et. al., 2015) морфотипов гемогрегаринов скальных ящериц, однако выделенные морфотипы не покрывают все морфологическое разнообразие паразитов скальных ящериц. Есть и примеры, где статистически подтвержденные морфотипы соответствуют разным видам (Tome et. al., 2019, Van As et. al., 2020). Tome et. al. (2019), например, для морфологической классификации использовали PCA (метод понижения размерности данных), который применяли мы, и который похож на нейросетевые методы.

Машинное обучение уже использовалось не только для предсказания различных процессов (например, сворачивания белка (Varadi et. al., 2023)), но и для подсчета количества клеток крови (Созоник, 2024, Nassar et. al., 2019, Alam & Islam, 2019, Tessema et. al., 2021).

Мы поставили перед собой цель проверить наличие статистически подтвержденных морфотипов гамонтов у ящериц рода *Darevskia*.

Мы поставили перед собой задачи проверить возможности некоторых нейросетевых методов на сравнительно малых (в масштабах машинного обучения) выборках и сравнить их успешность с более классическими методами для тех же задач.

Литобзор

Скальные ящерицы рода *Darevskia*

Размеры тела варьируют у разных видов. Туловище уплощенное, что является адаптацией к жизни в узких трещинах скал. Хвост длинный, часто превышает длину тела. Голова заметно уплощена. Межчелюстной щиток, как правило, не касается ноздри. Основной фон спины может быть сероватым, коричневатым, зеленоватым, желтоватым или почти черным. Рисунок на спине часто состоит из сложного узора из темных пятен, крапинок, извилин, образующих иногда сетчатый или глазчатый рисунок. У многих видов по центру спины проходит в разной степени выраженная темная полоса. Брюхо обычно окрашено в более светлые тона: желтоватое, оранжевое, розоватое или зеленоватое, иногда с темными крапинками. Чешуя мелкая, зернышкообразная, с слабо выраженными ребрышками. Их количество, форма и расположение являются важным признаком для определения видов. Серия увеличенных пор на нижней стороне бедер; их количество

достигает у разных видов 10-20 и более. Это характерный признак для многих ящериц. Чешуя на голени окружена кольцом из крупных щитков.

Строго связаны со скальными выходами, каменистыми осыпями, обрывами, стенами зданий.

Характерно крайняя осторожность и пугливость. При малейшей опасности стремительно скрываются в узких расщелинах между камнями. Прекрасно лазают по вертикальным каменистым поверхностям. Дневные животные. Активность сильно зависит от температуры и солнечного освещения. Часто можно наблюдать греющимися на солнце. Насекомоядные. Рацион состоит из насекомых и других беспозвоночных, которых ящерицы ловят на скалах и в окружающей растительности. Группа эндемична для Кавказа. Ареал охватывает Большой и Малый Кавказ, простираясь от Черного до Каспийского моря.

Род *Hepatozoon* (тип *Apicomplexa*, отряд *Adeleorina*) представляет собой широко распространенных кровепаразитов позвоночных, включая рептилий, амфибий, птиц и млекопитающих. Их жизненные циклы являются гетероксенными, требующими как минимум двух хозяев: промежуточного (позвоночного), в тканях которого происходит мерогония (бесполое размножение), и окончательного (чаще всего кровососущего членистоногого), в котором протекает гаметогенез, оплодотворение и спорогония (половое размножение)

Гамонты: Крупные, вытянутые с загнутым задним концом и плотным ядром в задней трети тела. Размеры и окраска (розово-фиолетовая с азурофильными гранулами) являются диагностическими признаками.

Мерогония: Обнаружены и описаны дизидные меронты, макромеронты (2–7 макромерозоитов) и микромеронты (9–24 микромерозоитов) в печени.

Спорогония: В комарах описаны уни- и бинуклеарные ооцисты ($\sim 54 \times 48$ мкм), спороцисты ($\sim 31.0 \times 21.8$ мкм) и крупные спорозоиты ($16.8\text{--}32.4 \times 4.0\text{--}9.0$ мкм) по 2–8 в спороцисте.

Жизненный цикл паразитов может проходить по нескольким сценариям, но общая схема выглядит так:

1. Заражение беспозвоночного: Когда комар или клещ кусает зараженную ящерицу, он вместе с кровью поглощает гамонты — стадию паразита, находящуюся в эритроцитах.
2. Размножение в беспозвоночном: В кишечнике беспозвоночного происходит половое размножение, в результате которого образуются спорозоиты — инвазионная стадия.
3. Передача позвоночному: Позвоночное животное (ящерица) заражается двумя путями:
Укус: Когда зараженное беспозвоночное кусает ящерицу и впрыскивает спорозоиты со слюной.
Поедание: Когда ящерица съедает зараженного беспозвоночного.
4. Развитие в ящерице: Попав в ящерицу, спорозоиты с током крови попадают в внутренние органы (печень, лёгкие), где образуют цисты и начинают мерогонию (бесполое деление), производя мерозоиты.
5. Выход в кровь: Мерозоиты выходят в кровоток и внедряются в эритроциты (красные кровяные клетки), где превращаются в гамонты. Именно эту стадию видят учёные под микроскопом в мазках крови. Заражённый эритроцит часто меняет форму, а его ядро смещается.
6. Замыкание цикла: Цикл замыкается, когда новое кровососущее беспозвоночное кусает эту ящерицу и поглощает гамонты

Двухозяйный цикл: Беспозвоночное, ящерица, то же беспозвоночное.

Трёххозяинный цикл: Беспозвоночное, ящерица, хищник (например, змея, которая съедает ящерицу), беспозвоночное (которое кусает змею).

Заражение редко приводит к смерти, однако в случаях заражения ящериц паразитами характерными для других видов, например В статье Wozniak et al. (1996) подробно описываются последствия экспериментального заражения трех видов ящериц (**Sceloporus undulatus**, **Eumeces obsoletus** и **Sceloporus poinsetti**) паразитом **Hepatozoon mocassini**, который обычно встречаются у змей.

У всех трех видов ящериц развились выраженные клинические признаки:

S. undulatus: тяжелая летаргия и анорексия на 15-й день после заражения

E. obsoletus: на 38-й день PI.

S. poinsetti: на 96-й день PI.

У всех ящериц к 14-му дню наблюдалось значительное увеличение общего количества лейкоцитов. Это выражалось в гетерофилии (увеличение числа гетерофилов, аналог нейтрофилов у млекопитающих) у всех видов, а также азурофилии/моноцитозе. Эти изменения указывают на активный воспалительный процесс. На 96-й день развилась паразитемия (4% эритроцитов были заражены гаметоцитами), которая сопровождалась ортохроматофильным эритробластозом (усиление выработки эритроцитов в ответ на их разрушение) и лейкоцитозом.

К 14-му дню наблюдалось значительное повышение активности аспартатаминотрансферазы (AST) в плазме, что является маркером повреждения тканей, особенно печени. Также отмечалось легкое повышение активности аланинаминотрансферазы (ALT), другого печеночного фермента. В печени всех ящериц были обнаружены меронты паразита (стадии бесполого размножения). Вокруг зрелых меронтов, содержащих мерозоиты, формировались многоочаговые скопления гетерофилов (воспалительных клеток), что приводило многоочаговым случайным некрозам гепатоцитов. Также наблюдалась инфильтрация меланомакрофагов (клетки, участвующие в иммунном ответе и очистке тканей) даже в участках без видимых меронтов.

В легких меронты паразита также были окружены скоплениями гетерофилов, что приводило к многоочаговому утолщению легочного интерстиция (воспалительная реакция в соединительной ткани легких)

В случае же с паразитами характерными для вида, последствия заражения намного мягче.

До этого уже предлагались два деления рода *Hepatozoon* по Бейеру (1968), и по Харутюнян (2015) Классификация по Бейеру предполагала 5 морфотипов, 4 (II - IV) из которых - гамонты, а ещё 1 (I) - шизонт.

Морфотип I:

Форма полулунная, вытянутая вдоль длинной оси эритроцита, иногда слегка изогнутая. Размер: $14.4 \pm 0.20 \times 2.33 \pm 0.07$ мкм. Цитоплазма окрашена в светло-голубой или светло-фиолетовый цвет, почти сливающийся с цитоплазмой эритроцита, из-за чего контуры паразита плохо видны. Имеет множество вакуолей в цитоплазме. Ядро занимает центральное положение. В периферической крови: встречаются длинные узкие формы. Делящихся стадий не обнаружено. Во внутренних органах (почки) наблюдается рост и сегментация (шизогония) этой формы внутри клеток крови данных органов. Реакция Фельгена положительная на всех стадиях развития. В стадиях из периферической крови зерна хроматина хорошо видны по краям ядра. Метилгрюн распределяется равномерно по всему ядру.

Морфотип II:

Форма вытянутая, часто сильно изогнутая. Размер: $16.07 \pm 0.20 \times 3.52 \pm 0.09$ мкм. Один конец тела расширен, другой — узкий, часто загнут под углом $90-180^\circ$ к длинной оси. Изогнутая часть иногда напоминает отдельную "головку", соединенную с основной массой паразита узким перешейком.

Паразит четко отделен от цитоплазмы клетки хозяина видимой капсулой (паразитарной вакуолью). Ядро вытянутое, расположено ближе к расширенной части тела. Имеет вид двух толстых нитей, соединенных более тонкими поперечными волокнами. Реакция Фельгена резко положительная. Боковые толстые нити окрашиваются особенно интенсивно.]

Морфотип III

Форма вытянутая, веретеновидная, оба конца заострены. Размер: $12.90 \pm 0.15 \times 4.50 \pm 0.28$ мкм. Характерное расположение относительно ядра клетки хозяина. (Добавить где) Цитоплазма кажется бесцветной, за исключением ярко окрашенных зерен на обоих концах тела. Ядро округлое, расположено ближе к одному из концов тела. Взаимодействие с хозяином наибольшее среди всех форм. Ядро паразита часто перекрывается ядром эритроцита, которое находится в тесном контакте с паразитом (несмотря на наличие PV). Ядро хозяина часто бывает вытянутым, фрагментированным или обвивается вокруг тела паразита. Цитоплазма эритроцита вокруг паразита окрашивается интенсивнее, чем остальная, контуры клетки могут быть размыты. Реакция Фельгена положительная. Зерна хроматина распределены по периферии ядра.

Морфотип IV

Тело четко делится на широкую, ретортовидную часть и длинный "хвост", составляющий около половины общей длины паразита. Размер (без "хвоста"): $22.03 \pm 0.30 \times 5.0 \pm 0.13$ мкм. При окраске по Гимзе тело паразита почти полностью равномерно окрашивается в красноватый цвет, кроме кончика "хвоста". Ядро идентифицировать сложно из-за сильной адсорбции красителя капсулой. Реакция Фельгена положительная. Положение ядра нестабильно: оно может находиться как в расширенной части тела, так и в "хвосте". Зерна хроматина видны по периферии ядра, центральная часть светлая. При окраске по Унна в светлой центральной зоне ядра выявляется розовое ядрышко.

Морфотип V

Форма овальная. Размер: $12.55 \pm 0.14 \times 5.88 \pm 0.07$ мкм. Поверхность тела паразита активно адсорбирует краситель, который располагается в виде выпуклых линий, соединяющих полюса клетки. Ядро занимает центральное положение. Реакция Фельгена положительная.

Классификация по Харутюнян предполагает 6 морфотипов

Морфотип I

Превалентность: 4.6% (самый редкий из обнаруженных) Тело тонкое и длинное, с округлыми краями. Цитоплазма окрашивается в розовый или фиолетовый цвет. Характерная черта — наличие вакуолей. Ядро паразита: Описание не предоставлено. (Добавить чтонибудь) Паразит располагается в центре эритроцита. Ядро заражённой клетки деформируется и меняет цвет с синего (норма) на фиолетовый.

Размеры паразита:

Средние: 3.8 ± 0.5 мкм (длина) $\times$ 1.5 ± 0.25 мкм (ширина). Макс. (у *D. armeniaca*): 4.5 ± 0.3 мкм $\times$ 1.4 ± 0.25 мкм. Мин. (у *D. valentini*): 3.35 ± 0.25 мкм $\times$ 1.3 ± 0.15 мкм.

Морфотип II

Превалентность: 9.2%. Имеет характерную изогнутую длинную форму. (Фотку прикрепить)
Цитоплазма почти бесцветная. Ядро паразита вытянутое, волокнистое, расположено на широкой стороне тела паразита. Ядро инфицированного эритроцита деформировано.

Размеры паразита:

Средние: 3.75 ± 0.8 мкм x 1.32 ± 0.65 мкм. Макс. (у *D. nairensis*): 4.28 ± 0.4 мкм x 1.38 ± 0.25 мкм.

Мин. (у *D. valentini*): 2.64 ± 0.25 мкм x 1.22 ± 0.25 мкм. Особенность: Описана отдельная изогнутая часть размером 1.2 ± 0.1 мкм x 0.8 ± 0.2 мкм.

Морфотип III

Превалентность: 21.35% (второй по распространённости). Тело заострённое. Цитоплазма обычно бесцветная, но иногда может окрашиваться в фиолетовый цвет. Ядро паразита чётко очерченное, округлое. Самая яркая черта — ядро клетки-хозяина становится округлым и выглядит как "глаз". Цитоплазма самого эритроцита окрашивается в светло-голубой цвет.

Размеры паразита:

Средние: 4.6 ± 0.9 мкм x 1.6 ± 0.4 мкм.

Макс. (у *D. dahli*): 5.41 ± 0.8 мкм x 4.8 ± 0.5 мкм. Мин. (у *D. nairensis*): 3.66 ± 0.9 мкм x 1.64 ± 0.25 мкм. Площадь ядра паразита — 0.08 мкм² (вероятно, имеется в виду 0.08 мкм²).

Морфотип IV

Превалентность: 5.09%. Тело крупное, грушевидное тело с длинным хвостом.

Ядро паразита крупное, окрашивается в фиолетовый или розовый цвет. Взаимодействие с клеткой хозяина: Паразит полностью окружает ядро эритроцита.

Размеры паразита:

Средние: 4.9 ± 0.6 мкм x 2.3 ± 0.5 мкм. Макс. (у *D. dahli*): 5.78 ± 0.4 мкм x 2.2 ± 0.5 мкм. Мин. (у *D. rostombekowi*): 4.2 ± 0.5 мкм x 2.1 ± 0.4 мкм. Длина хвоста этой формы составляет 5.81 ± 0.7 мкм.

Морфотип V

Превалентность: 18.21%. Тело овальное. Цитоплазма светло-фиолетового цвета. В цитоплазме присутствуют продольные тяжи (триггеры), окрашенные в светло-фиолетовый или розовый цвет. Ядро паразита расположено в центре тела.

Размеры паразита:

Средние: 4.7 ± 0.5 мкм x 2.5 ± 0.35 мкм. Макс. (у **D. dahli**) : 5.83 ± 0.5 мкм x 2.8 ± 0.25 мкм. Мин. (у **D. rostombekowi**) : 4.14 ± 0.2 мкм x 2.3 ± 0.25 мкм.

Морфотип VI

Превалентность: 41.6% (наиболее распространённый). Форма тела наиболее вариабельная — может быть овальной, округлой или удлинённой.

Цитоплазма наиболее разнообразная по окраске — бесцветная, желтая, розовая или фиолетовая.

Ядро паразита расположено в центре тела.

Размеры паразита:

Средние: 3.4 ± 0.4 мкм x 1.6 ± 0.15 мкм. Макс. (у *D. rostombekowi*): 5.53 ± 0.25 мкм x 1.53 ± 0.35 мкм. Мин. (у *D. gaddei*): 3.7 ± 0.2 мкм x 1.5 ± 0.25 мкм

Однако такое разделение не покрывает всего морфологического разнообразия гемогрегаринов.

Кроме того, есть примеры, где статистически подтвержденные морфотипы не соответствуют реальным видам. Например в статье Vans. et. al. 2020, где при анализе паразитов они были разделены на 2 морфотипа, каждый из которых подтвердился как вид в результате генетического анализа. При этом в один вид входили паразиты принадлежавшие разным морфотипам в прошлых классификациях.

В исследование были включены три партеногенетических (*D. armeniaca*, *D. dahli* и *D. unisexualis*) и три бисексуальных (*D.*

portschinskii, *D. valentini* и *D. raddei nairensis*) были включены в исследование.

D. portschinskii и *D. valentini* принадлежат к кладу *rudis*, а *D. raddei nairensis* представляет кладу *caucasica*.

D. dahli - партеногенетический вид, возникший в результате гибридизации самца *D. portschinskii* и самки *D. mixta*, другого бисексуального вида, относящегося к группе *caucasica* (Tarkhnishvili et al., 2017). *D. armeniaca* происходит от нескольких независимых гибридизаций между самцом *D. valentini* и самкой *D. mixta* (Girnykn et al., 2018) или *D. dahli* (Tarkhnishvili et al., 2017). *D. unisexualis* произошел от гибридизации между самцом *D. valentini* и самкой *D. raddei nairensis* (Vergun et al., 2020). Все виды ограничены скальными местообитаниями или искусственными местообитаниями, имитирующими скалы, такими как каменные и бетонные здания или отвалы (Даревский, 1967). Ареалы распространения этих видов в значительной степени перекрываются. В Армении было выбрано пять участков для исследования. Первый из них, обозначенный как SH, расположен на одиночном пологом холме в окрестностях города.

Река Ахурян. Холм был в основном покрыт короткой травой, но ящерицы сосредоточились на его вершине в нескольких каменистых ямах с различными видами *Lamiaceae* и *Artemisia*. На этом участке исследования встречались только *D. valentini*. Данные собирались здесь в июле 2022 года, мае и июне 2023 года.

Второй участок исследования, обозначенный как SR, находился на правом берегу реки Ашоцк, левого притока Ахурьян, в непосредственной близости от ручья. Он находился всего в 700 м от SH, но участки были разделены рекой Ашоцк.

Здесь было несколько скоплений камней и скал, и ящерицы в основном обитали на них. Остальная территория была покрыта короткой травой, на которой постоянно пасся скот. *D. valentini* и *D. armeniaca* были собраны здесь в мае и июле 2022 года, а также в мае, июне и сентябре 2023 года.

Третье место исследования, обозначенное как AC, находилось в каньоне реки Дзорагет недалеко от села Амрацитс, провинция Лори. Заброшенная гидроэлектростанция из бетона и туфа располагалась на дне каньона. Многочисленные расщелины в ее стенах служили убежищем для ящериц. Над электростанцией находился крутой склон, усыпанный камнями разного размера. Мы часто наблюдали ящериц и на этих камнях. Как склон, так и территория электростанции были покрыты высокой травой, в основном различными видами *Poaceae*, *Lathyrus* sp., *Utrica* sp. и *Galium* sp.

В апреле, мае, июне и сентябре 2023 года мы собрали на этом участке *D. armeniaca*, *D. dahli* и *D. portschinskii*.

Четвертый участок исследования, обозначенный как GG, был расположен на каменистом склоне холма в окрестностях деревни Гаргар, Лорийская область. Камни были разбросаны по всему склону холма. Растительность не была сильно выпасена, как в SH и SR, хотя и не была такой высокой, как в AC. Основными видами были

Poaceae, *Salvia* sp., *Trifolium* spp., *Verbascum thapsus*. Небольшие группы *Stipa* sp. находились на вершине холма. В мае 2023 года мы собрали *D. portschinskii* и *D. dahli* на этом участке, хотя позже, в июле 2025 года, там было замечено несколько *D. armeniaca*.

Пятый участок исследования, обозначенный как HR, находился в окрестностях города Раздан, провинция Котайк.

Он был зажат между водохранилищем Раздан и автомагистралью. Там находились три заброшенных туфовых здания, соединенных бетонными тропами. Берега водохранилища были крутыми, построенными из камней и лишенными растительности. Ящерицы были многочисленны как на зданиях, так и на берегах водохранилища. Здания были окружены высокой травой, кустами шиповника (*Rosa canina*), сливовыми деревьями (*Prunus domestica*) и вишневыми деревьями (*Prunus cerasus*). *D. armeniaca*, *D. unisexualis* и *D. raddei nairensis* были собраны там в мае, июне и сентябре 2023 года. Краткое изложение данных по местам сбора приведено в таблице 1.

Животные вручную или с помощью петли. Длина от носа до клоаки (SVL) измерялась с помощью металлической линейки с точностью до 1 мм. Масса тела измерялась с помощью весов MODEL. В выборку включались только особи с SVL > 55 мм. Как в 2022, так и в 2023 году мы собирали мазки крови с кончиков хвостов.

Они были высушены на воздухе, транспортированы в лабораторию без окрашивания и окрашены в соответствии с модификацией протокола Романовского-Гимзы, предложенной Райтом (Wright, 1902). Затем мазки изучались с помощью микроскопа. Их сушили на воздухе, транспортировали в лабораторию без окрашивания и окрашивали в соответствии с модификацией протокола Романовского-Гимзы, предложенной Райтом (Wright, 1902). Затем мазки изучали с помощью микроскопа Carl Zeiss AxioStar plus при увеличении $\times 400$. Микрофотографии делали с помощью цифровой камеры TopCam SCMOS05100KPA.

В 2023 году мы также собирали образцы сыворотки крови для измерения концентрации половых стероидов.

В 2023 году мы также собрали образцы сыворотки крови для измерения концентрации половых стероидов.

Забор крови проводился в три этапа (май, июнь и сентябрь) в SR и AC, в мае и сентябре в HR, в июне и сентябре в SH и в мае в GG (табл. 1).

100-150 мкл крови из каудальной вены собирали в 0,5-миллилитровые центрифужные пробирки и центрифугировали при 3000 g в течение 10 минут. Супернатант собирали в 2-миллилитровые герметичные пробирки и хранили при -20 °C до транспортировки в лабораторию. В лаборатории пробирки хранили при -80 °C до проведения ELISA. Мы рассчитали паразитарную нагрузку для каждого индивидуума как долю эритроцитов (RBC), инфицированных гамонтами гемогregarин, от всех эритроцитов, включая гетерохроматические эритроциты. Если общее количество эритроцитов для индивидуума было менее 1000, он исключался из выборки.

Животные, у которых не было обнаружено паразитов, считались не зараженными. Наличие инфекции для каждой когорты (т. е. пола и вида) рассчитывалось как доля зараженных животных в данной когорте.

Мы обучили модель компьютерного зрения YOLOv8m подсчитывать здоровые эритроциты, а модель YOLOv10s — рассчитывать зараженные эритроциты. Обученные модели далее именуется YOLOrbc и YOLOinfected. Мы использовали пакет Python ultralytics (<https://github.com/ultralytics/ultralytics>) для обучения и проверки обеих моделей. YOLOinfected.

Мы использовали пакет Python ultralytics (<https://github.com/ultralytics/ultralytics>) для обучения и валидации обеих моделей. YOLOrbc была обучена на 18027 объектах из 168 микрофотографий 13 индивидуумов и валидирована на 2282 изображениях эритроцитов из 42 микрофотографий. YOLOinfected был обучен на 1462 инфицированных эритроцитах из 1067 микрофотографий 20 человек и проверен на 831 инфицированном эритроците из 605 микрофотографий. Аннотирование изображений выполнялось в CVAT (<https://github.com/cvat-ai/cvat>).

Материалы и Методы

В исследование были включены три партеногенетических (*D. armeniaca*, *D. dahli* и *D. unisexualis*) и три двуполых (*D. portschinskii*, *D. valentini* и *D. raddei narensis*). *D. portschinskii* и *D. valentini* принадлежат к кладу *rudis*, а *D. raddei narensis* представляет кладу *caucasica*. *D. dahli* - партеногенетический вид, возникший в результате гибридизации самца *D. portschinskii* и самки *D. mixta*, другого бисексуального вида, относящегося к группе *caucasica* (Tarkhnishvili et al., 2017). *D. armeniaca* происходит от нескольких независимых гибридизаций между самцом *D. valentini* и самкой *D. mixta* (Girnykn et al., 2018) или *D. dahli* (Tarkhnishvili et al., 2017). *D. unisexualis* произошел от гибридизации между самцом *D. valentini* и самкой *D. raddei narensis* (Vergun et al., 2020) (рис. 1).

Все виды приурочены к скальным местообитаниям или искусственными местообитаниями, имитирующими скалы, такими как каменные и бетонные здания или свалки (Даревский, 1967). В Армении ареалы этих видов широко перекрываются, и известно несколько симпатрических зон (Petrosyan et. al. 2020) В Армении было выбрано пять участков.

Первый из них, обозначенный как SH, расположен на одиночном пологом холме в окрестностях города. пологом холме в окрестностях села Мец Сепасар Ширакской области, на левом берегу реки Река Ахурян. Холм был в основном покрыт короткой травой, но ящерицы сосредоточились на его вершине в нескольких каменистых ямах с различными видами *Lamiaceae* и *Artemisia*. На этом участке исследования встречались только *D. valentini*. Данные собирались здесь в июле 2022 года, мае и июне 2023 года. Второй участок исследования, обозначенный как SR, находился на правом берегу реки Ашоцк, левого притока Ахурьян, в непосредственной близости от ручья. Он находился всего в 700 м от SH, но участки были разделены рекой Ашоцк. Здесь было несколько скоплений камней и скал, и ящерицы в основном ограничивались ими. Остальная часть участка была покрыта короткой травой, постоянно выпасаемой крупным рогатым скотом. *D. valentini* и *D. armeniaca* были собраны здесь в мае и июле 2022 года, а также в мае, июне и сентябре 2023 года. Третье место исследования, обозначенное как AC, находилось в каньоне реки Дзорагет недалеко от села Амрацитс, провинция Лори. Заброшенная гидроэлектростанция из бетона и туфа располагалась на дне каньона. Многочисленные расщелины в ее стенах служили убежищем для ящериц. Над электростанцией находился крутой склон, усыпанный камнями разного размера. Мы часто наблюдали ящериц и на этих камнях. Как склон, так и территория электростанции были покрыты высокой травой, в основном различными видами *Roaceae*, *Lathyrus sp.*, *Utrica sp.* и *Galium sp.* В апреле, мае, июне и сентябре 2023 года мы собрали на этом участке *D. armeniaca*, *D. dahli* и *D. portschinskii*. Четвертый участок исследования, обозначенный как GG, находился на каменистом склоне холма вблизи деревни Гаргар, провинция Лори. Камни были разбросаны по

всему склону холма. Растительность была не очень густой. *Poaceae*, *Salvia sp.*, *Trifolium spp.*, *Verbascum thapsus*. Небольшие группы *Stipa sp.* находились на вершине холма. В мае 2023 года мы собрали *D. portschinskii* и *D. dahli* на этом участке, хотя позже, в июле 2025 года, там было замечено несколько *D. armeniaca*. Пятый участок исследования, обозначенный как HR, находился в окрестностях города Раздан, провинция Котайк. Он был зажат между водохранилищем Раздан и автомагистралью. Там находились три заброшенных туфовых здания, соединенных бетонными тропами. Берега водохранилища были крутыми, построенными из камней и лишенными растительности. Ящерицы были многочисленны как на зданиях, так и на берегах водохранилища. Здания были окружены высокой травой, кустами шиповника (*Rosa canina*), сливовыми деревьями (*Prunus domestica*) и вишневыми деревьями (*Prunus cerasus*). *D. armeniaca*, *D. unisexualis* и *D. raddei nairensis* были собраны там в мае, июне и сентябре 2023 года.

Краткое изложение данных по местам сбора приведено в таблице 1.

Участок	Двуполые виды	Партеногене- тические виды	Шир.	Долг.	Выс.	Даты взятия мазков	Даты забора проб сыворотки
SH	<i>D. valentini</i>	-	43.8297 51	41.0313 05	2000	11.07.2022- 12.07.2022, 23.05.2023, 12.06.2023- 13.06.2023	23.05.2023, 12.06.2023- 13.06.2023
SR	<i>D. valentini</i>	<i>D. armeniaca</i>	43.8354 33	41.0360 27	2000	26.05.2022 - 28.05.2022, 06.07.2022 - 15.07.2022, 24.05.2023- 25.05.2023, 10.06.2023- 12.06.2023, 18.09.2023- 19.09.2023	24.05.2023- 25.05.2023, 10.06.2023- 12.06.2023, 18.09.2023- 19.09.2023
AC	<i>D. portschinskii</i>	<i>D. armeniaca, D. dahli</i>	44.4330 72	41.0001 99	1200	25.04.2023, 28.05.2023- 30.05.2023, 15.06.2023- 16.06.2023, 13.09.2023- 15.09.2023	28.05.2023- 30.05.2023, 15.06.2023- 16.06.2023, 13.09.2023- 15.09.2023
GG	<i>D. portschinskii</i>	<i>D. dahli</i>	44.4366 54	40.9586 42	1600	29.05.2023- 30.05.2023	29.05.2023- 30.05.2023
HR	<i>D. raddei nairensis</i>	<i>D. armeniaca, D. unisexualis</i>	44.7485 75	40.5062 04	1600	12.05.2023, 03.06.2023- 06.06.2023, 08.09.2023- 11.09.2023	03.06.2023- 06.06.2023, 08.09.2023- 11.09.2023

Таблица 1. Информация о сборах мазков

Длина от кончика носа до клоакальной щели (SVL) измерялась с помощью металлической линейки с точностью до 1 мм. В выборку включали только особей с $SVL > 55$ мм. Для взятия мазков крови у ящериц отрывали конец хвоста. Мазки высушивали на воздухе, транспортировали в лабораторию без окрашивания, а затем окрашивали по протоколу Романовского-Гимзы, в модификации Райта (Wright, 1902). Затем мазки изучали с помощью микроскопа Carl Zeiss AxioStar plus при увеличении $\times 400$. Микрофотографии делали с помощью цифровой камеры TouPCam SCMOS05100KPA. Модель компьютерного зрения, модель YOLOv10s была обучена подсчитывать зараженные эритроциты. Обученная модели YOLOinfected.

Мы использовали пакет Python ultralytics (<https://github.com/ultralytics/ultralytics>) для обучения и проверки обеих моделей. YOLOrbc была обучена на 18027 объектах из 168 микрофотографий 13 индивидуумов и проверена 2282 изображениях эритроцитов из 42 микрофотографий. YOLOinfected был обучен на изображениях 1462 инфицированных эритроцитов из 1067 микрофотографий от 20 ящериц и проверена на 831 инфицированном эритроците из 605 микрофотографий. Аннотирование изображений выполнялось в CVAT (<https://github.com/cvat-ai/cvat>).

Режим предсказания, реализованный в ultralytics, позволяет настраивать точность и воспроизводимость модели путем выбора порогового уровня уверенности обнаружения объектов. Чтобы выбрать оптимальный порог для каждой модели, мы рассчитали коэффициенты ложноположительных, истинно положительных и ложноотрицательных обнаружений на валидационных наборах данных при заданном пороговом уровне достоверности 0, 0,01 ... 0,99, 1. Обнаружение считалось истинным положительным, если пересечение над объединением (IoU) прогнозируемого поля связывания и истинного поля связывания было больше 0,6. Был выбран порог уровня достоверности, максимизирующий показатель F1 для каждой модели..

Мы вырезали отдельно каждый зараженный эритроцит с помощью модулей PIL (Umesh, P., 2012), numpy (Harris, Millman, 2020), os (Стандартный модуль Python), затем мы разместили 496 инфицированных эритроцитов в CVAT (<https://github.com/cvat-ai/cvat>), отметив ядро и цитоплазму эритроцита, а также паразити форную вакуоль (Рис. 1). Затем мы посчитали для каждой размеченной части длину, ширину и площадь. Длина находилась как наиболее длинный отрезок, соединяющий две точки измеряемой формы, ширина - как аналогичный отрезок, перпендикулярный длине.

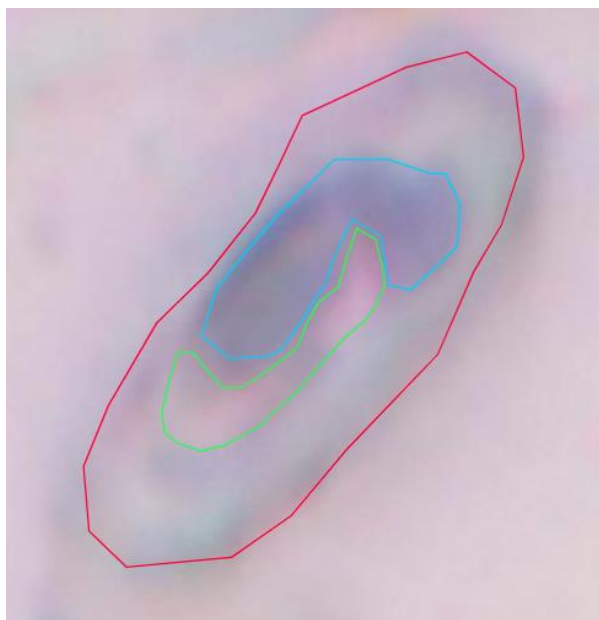


Рис. 1. Пример разметки, зеленым отмечена паразитическая вакуоль, синим и красным - ядро и мембрана самого эритроцита.

Для кластеризации изображений по морфологическим признакам зараженных эритроцитов мы использовали следующие методы (табл. 2)

Метод анализа признаков	Размер выборки (кл.)	Кол-во кластеров	Метод кластеризации
SwAV	6188	15	Meanshift
PCA	496	0	-
UMAP	496	4, 6*, 6	K-means, dbscan

Табл. 2. Методы, примененные для кластеризации. ai - методы машинного обучения, стат. - классические статистические методы. * - K-means использовался два раза

Для автоматического поиска значимых для классификации признаков использовали SwAV (<https://github.com/facebookresearch/swav>). Для кластеризации изображений по признакам, выделенным предобученной SwAV мы использовали DBSCAN (Ester M. et. al 1996) и Meanshift (https://github.com/scikit-learn/scikit-learn/blob/main/sklearn/cluster/_mean_shift.py).

Также мы обучили SwAV на наших данных - и получили три дополнительных разбиения на кластеры - от внутренней кластеризации, и от DBSCAN и Meanshift.

Для анализа выделенных вручную признаков мы использовали 2 метода понижения размерности - PCA и UMAP. Так как первые 3 параметра PCA описывали более 90% дисперсии точек (рис. 2) мы кластеризовали только по ним.

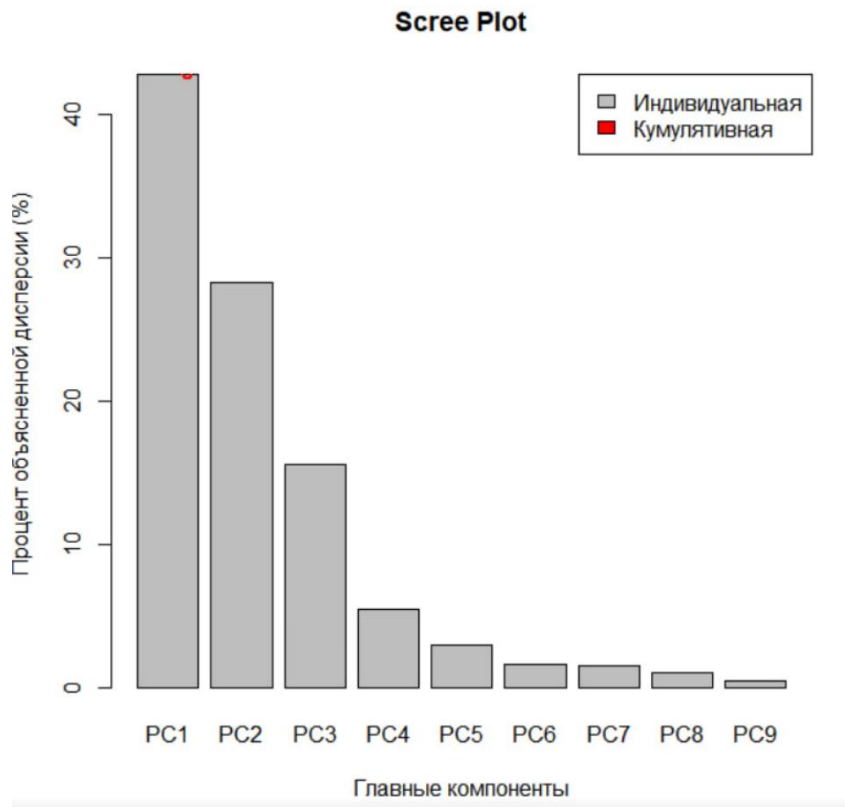


Рис. 2. Какую часть дисперсии описывает каждая из компонент PCA

Далее мы кластеризовали по выделенным параметрам с помощью DBSCAN (с автоматическим определением количества кластеров) и с помощью K-means. Для кластеризации K-means всегда использовалось $k=6$, для сравнения с морфотипами Аракелян, а также шла кластеризация на количество кластеров, равное количеству пиков плотности выделенных с помощью KDE. Так как было видно 3 и 4 пика плотности для результатов PCA и UMAP, выделялось по 3 и 4 кластера соответственно.

Для сравнения выделенных кластеров/морфотипов по совокупности признаков использовали MANOVA (Sthle L., Wold S., 1990), а для сравнения попарно по каждому признаку ANOVA (Fisher R. 1936)

Также для сравнения распределения точек в результате тестов Umap и PCA со случайными точками проводился следующий тест:

1. Мы генерировали 495 случайных точек с теми же минимумом и максимумом по каждому из 9 измеренных параметров
2. 100 раз бралось по 50 точек (на PCA, UMAP на оригинальных и случайных данных)
3. Каждые такие 50 точек кластеризовались с помощью K-means на то же количество кластеров, что и оригинальное распределение точек (в случае PCA на 3 и 6, UMAP - на 4 и 6 соответственно)
4. Для каждой пары гомологичных кластеров считалось IoU между соответствующими кластерами наборов точек. Гомологичными считались кластеры, у которых хотя бы 30% общих точек от каждого кластера.

5. Распределения этих значений IoU попарно сравнивались между соответственными оригинальными и случайными данными (т. е., например, сравнивались 4 кластера на основе UMAP на случайных и оригинальных данных)

Весь код для работы со SwAV и кластеризации на ее основе был написан на языке программирования Python и запущен в среде google colab. Вся работа с измеренными вручную данными проводилась в среде R версии 3.2.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение значимых признаков SwAV (Рис. 3, 4) и дальнейшая кластеризация Meanshift выявили 15 морфотипов. В 14 из них суммарно попало всего 58 изображений.



Рис. 3. Примеры изображений, из кластеров, полученных с помощью SwAV и Meanshift. Кластер 0.



Рис. 4. Примеры изображений, из кластеров, полученных с помощью SwAV и Meanshift. Слева направо - кластеры 1, 3, 6. Клетка, попавшая в кластер 3, по видимому, - гранулоцит.

При запуске DBSCAN не было выделено ни одного кластера - все изображения относились к кластеру “шум”.

Обучение SwAV и использование внутренней кластеризации дало 70 разных кластеров размерами от 1 до 2101 изображения, запуск DBSCAN и Meanshift на признаках, выделенных ей, не выделил ни одного кластера.

При использовании PCA по компонентам PC1 и PC2 (рис. 5) в полученном облаке точек было 3 пика плотности, поэтому кластеризация шла на 6 и 3 кластеров соответственно.

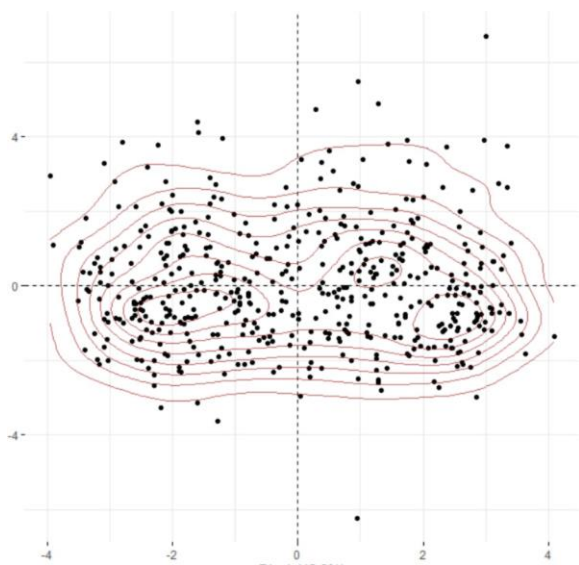


Рис. 5. Распределение по первым двум компонентам PCA. По оси x - PC1(42.8%), по оси y - PC2(28.3%).

При использовании UMAP также проводилась оценка по компонентам UMAP1 и UMAP2 (рис. 6)

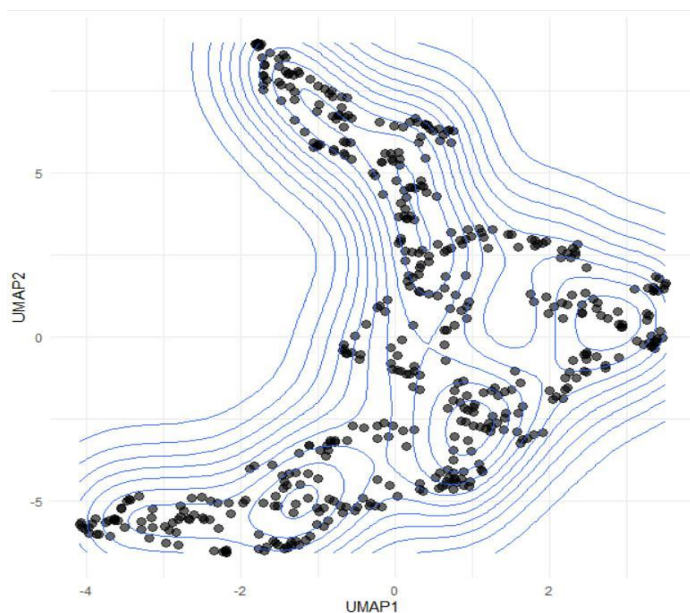


Рис. 6. Распределение по компонентам UMAP1, UMAP2

В результате использования K-means было выделено 4 и 6 кластеров соответственно, dbscan определил 6 разных групп. 4 кластера- так как видно 4 пика плотности.

Ниже приведены результаты запусков K-means (на 4 и 6 кластеров) и dbscan на UMAP соответственно. (рис. 7, 9, 11), а также примеры изображений для каждого из кластеров (рис. 12-14). Также представлено сравнение кластеров K-means на оригинальных данных и на случайных (рис. 8, 10)

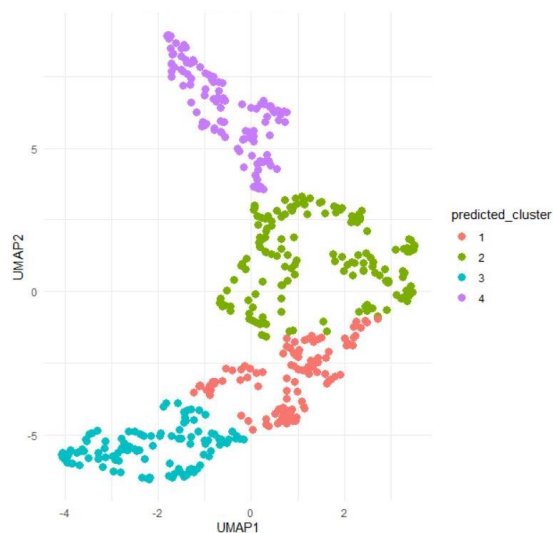


Рис. 7. Распределение на 4 кластера с помощью K-means. По оси x - UMAP1, по оси y - UMAP2. Разными цветами обозначены разные кластеры. Различия между кластерами достоверны: Ширина ядра: $p\text{-value} = 0.749901$, остальные параметры: $p\text{-value} \leq 0.00001$, PERMANOVA: $R^2=0.9007106$, $p < 0.00001$

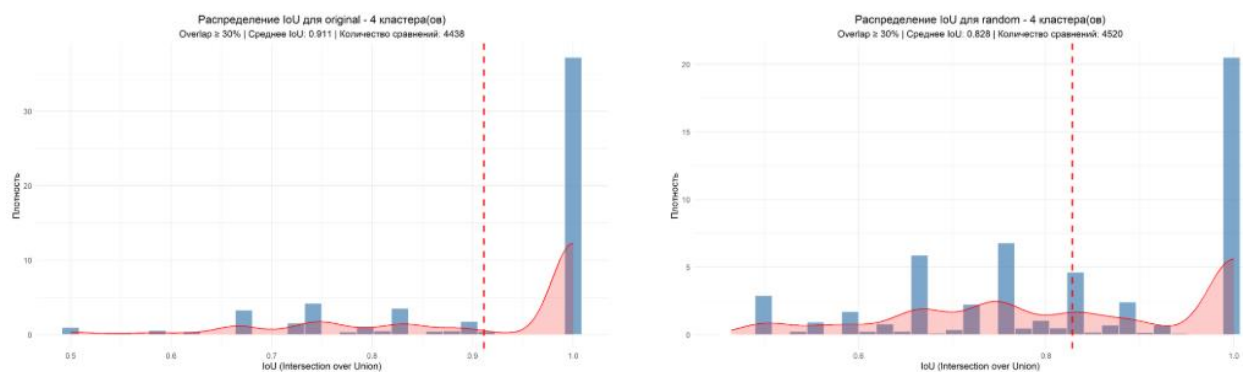


Рис. 8. Сравнение однозначности кластеризации на оригинальных (слева) и на случайных (справа) данных. Отличия достоверны - тест Манна-Уитни $p < 0.000001$

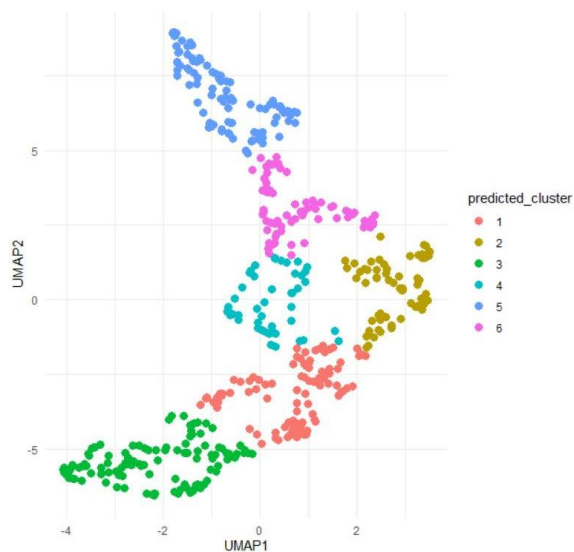


Рис. 9. Распределение на 6 кластеров с помощью K-means. По оси x - UMAP1, по оси y - UMAP2. Разными цветами обозначены разные кластеры. Различие между кластерами достоверно ANOVA: Ширина ядра: p-value = 0.052322, остальные параметры: p-value ≤ 0.00001 , PERMANOVA: $R^2=0.9386031$ p <0.00001

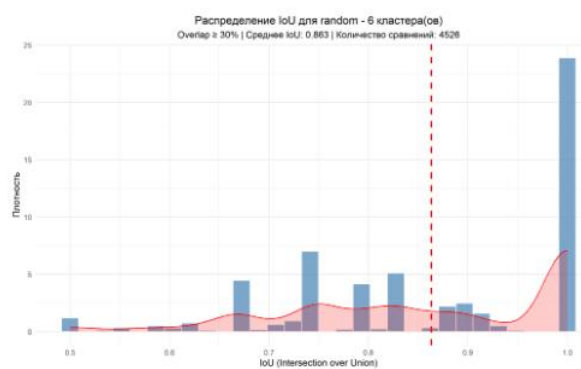
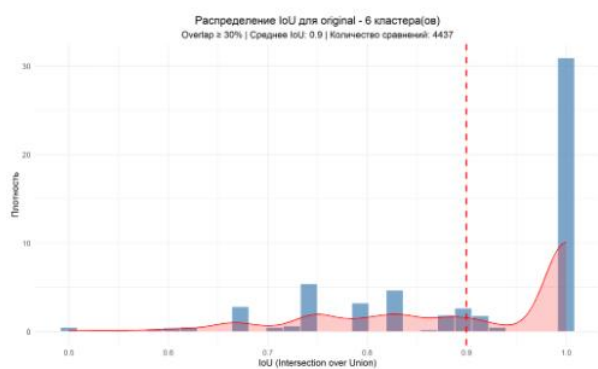


Рис. 10. Сравнение однозначности кластеризации на оригинальных (слева) и на случайных (справа) данных. Отличия достоверны - тест Манна-Уитны p <0.000001

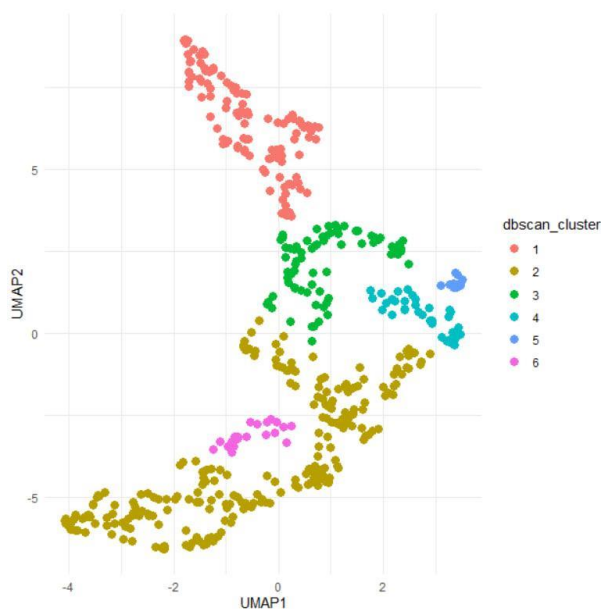


Рис. 11. Распределение на кластеры с помощью dbscan. По оси x - UMAP1, по оси y - UMAP2. Разными цветами обозначены разные кластеры. Различие между кластерами достоверно ANOVA: Ширина ядра: p-value = 0.128699, остальные параметры: p-value ≤ 0.00001 , PERMANOVA: $R^2=0.8126061$, $p < 0.00001$

Видно, что кластеры достаточно полные (нет кластеров резко отличающихся количеством изображений) однако фактические их отличия не ясны. (Рис.12-14)

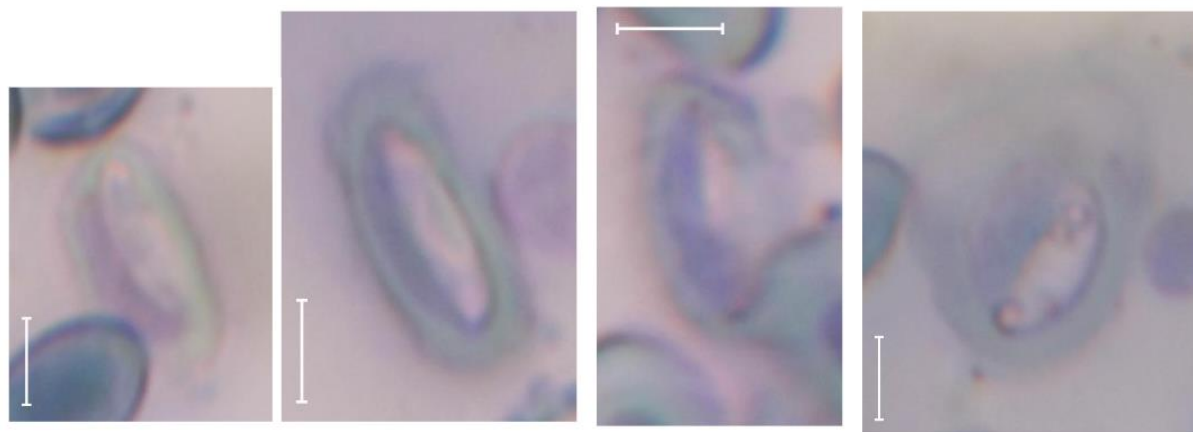


Рис. 12. Паразиты, типичные для 4х кластеров, выделенных K-means на основе UMAP. Кластеры с 1 по 4 слева направо. Масштабный отрезок - 100 пикселей.



Рис. 13. Паразиты, типичные для 6ти кластеров, выделенных K-means на основе UMAP. Кластеры с 1 по 6 слева направо, сверху вниз. Масштабный отрезок - 100 пикселей.



Рис. 14. Паразиты, типичные для 6ти кластеров, выделенных dbscan на основе UMAP. Кластеры с 1 по 6 слева направо, сверху вниз. Масштабный отрезок - 100 пикселей.

Ниже приведены результаты запусков K-means (на 3 и 6 кластеров) и dbscan на PCA (первых трех компонентах) соответственно. (рис. 15, 16, 18), а также примеры изображений для каждого из кластеров (рис. 20-22). Также представлено сравнение кластеров K-means на оригинальных данных и на случайных (рис. 17, 19).

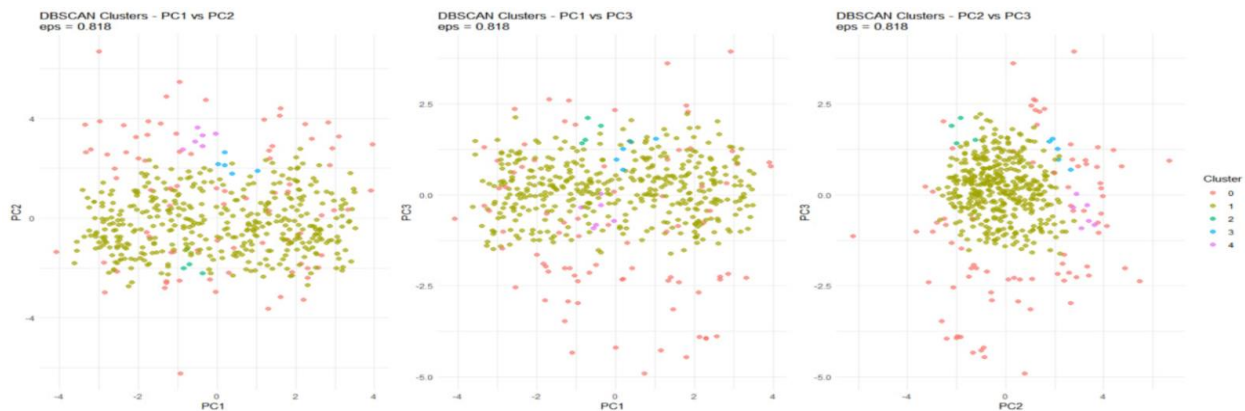


Рис. 15. Кластеры, выделенные DBSCAN на первых трех компонентах PCA, процент шума - 16.57, ANOVA: PC1 - $p=0.913$, PC2 - $p\leq 0.00001$, PC3 - $p\leq 0.00001$, различимы по всем признакам, $p\text{-value}\leq 0.02$, PERMANOVA: $R^2 = 0.0424$, $p=0.001$

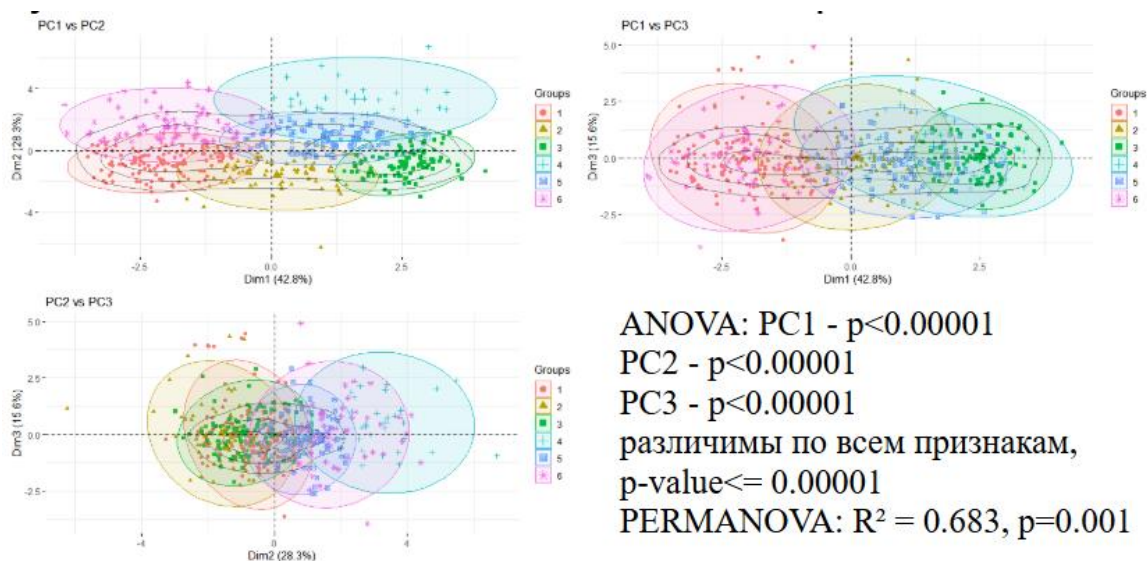


Рис. 16. 6 кластеров, выделенные K-means на первых трех компонентах PCA. Различия между кластерами достоверны.

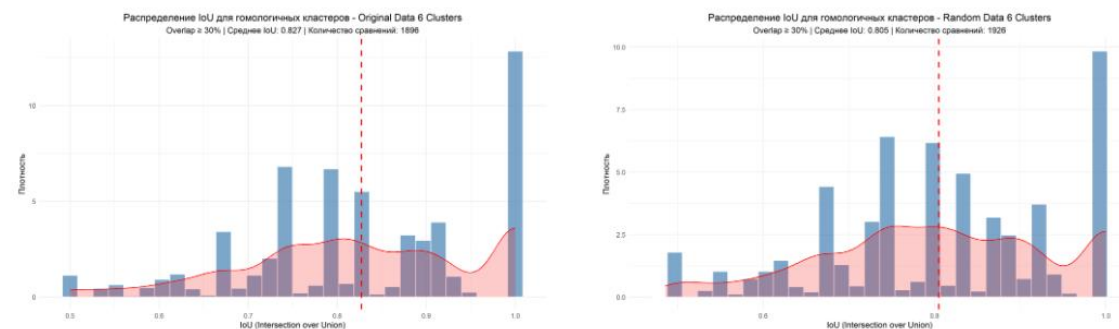


Рис. 17. Сравнение однозначности кластеризации на оригинальных (слева) и на случайных (справа) данных. Отличия достоверны - тест Манна-Уитни $p<0.000001$

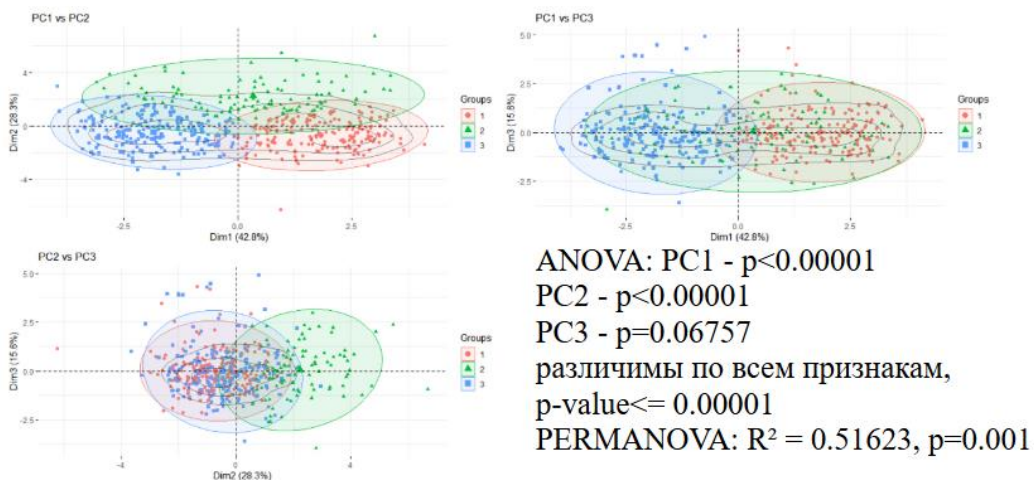


Рис. 18. 3 кластера, выделенные К-means на первых трех компонентах PCA. Различия между кластерами достоверны.

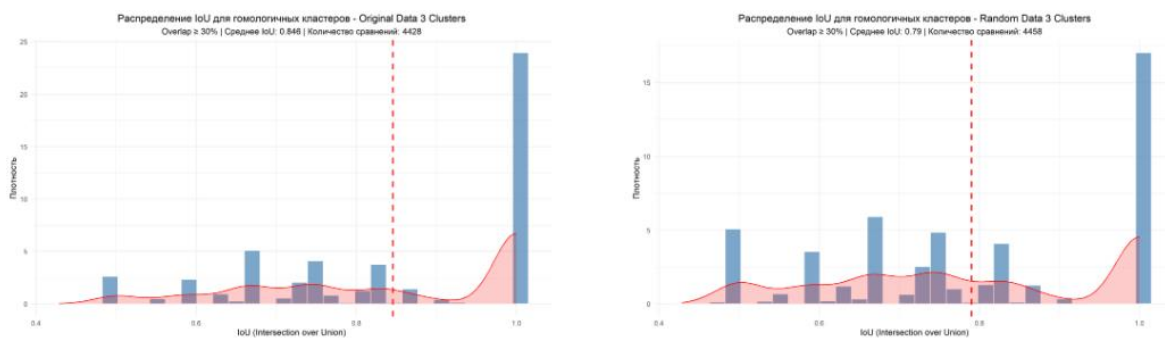


Рис. 19. Сравнение однозначности кластеризации на оригинальных (слева) и на случайных (справа) данных. Отличия достоверны - тест Манна-Уитни $p < 0.000001$

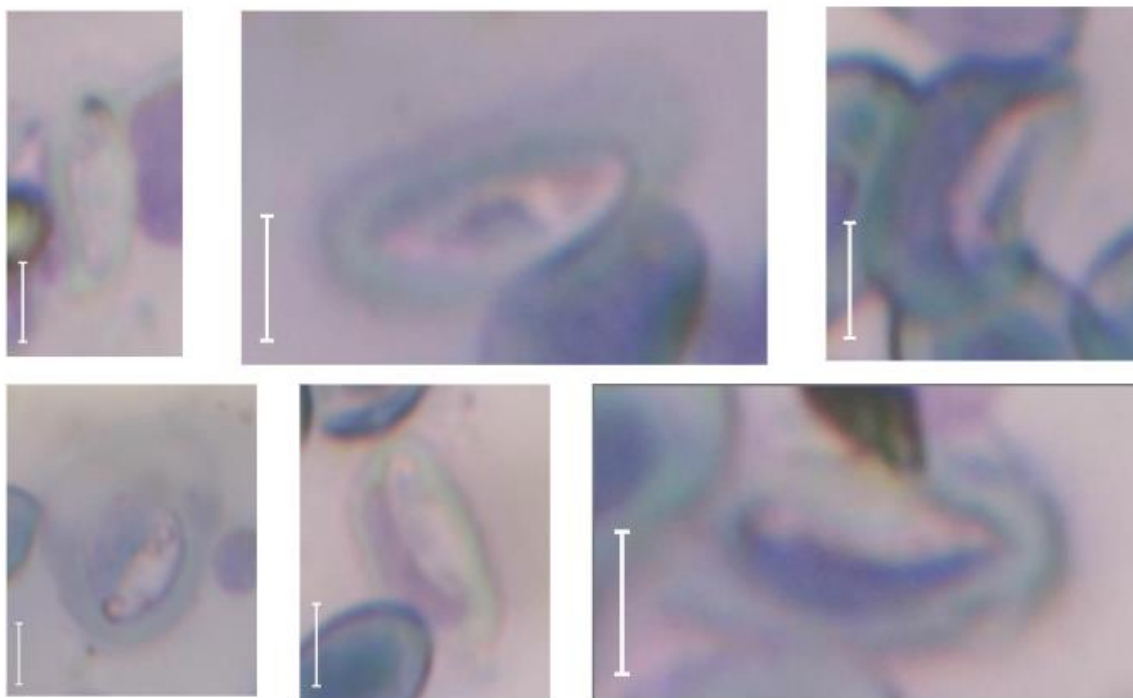


Рис. 20. Паразиты, типичные для 6ти кластеров, выделенных K-means на основе первых трех компонент PCA. Кластеры с 1 по 6 слева направо, сверху вниз. Масштабный отрезок - 100 пикселей.



20. Паразиты, типичные для 3х кластеров, выделенных K-means на основе первых трех компонент PCA. Кластеры с 1 по 3 слева направо. Масштабный отрезок - 100 пикселей.

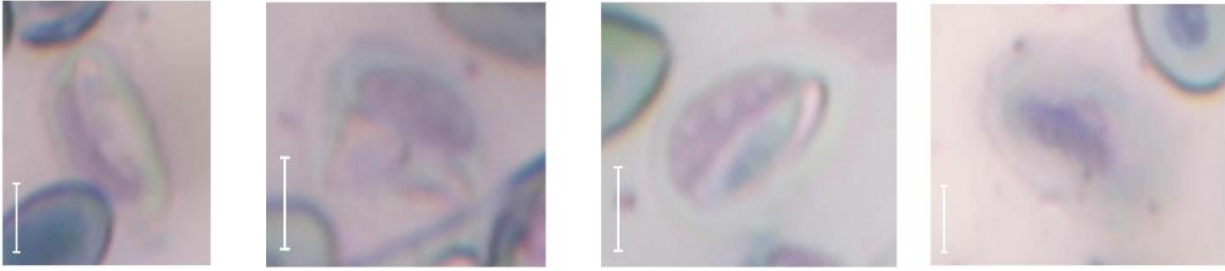


Рис. 20. Паразиты, типичные для 4х кластеров, выделенных DBSCAN на основе первых трех компонент PCA. Кластеры с 1 по 4 слева направо. Масштабный отрезок - 100 пикселей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование нейросети не принесло ожидаемых плодов - полученные 15 кластеров, несмотря на возможные отличия между ними, не имеют отношения к нашим целям и задачам - часть из них - просто одиночные фотографии с крупными артефактами, часть - не эритроциты, попавшие в выборку за счет погрешностей в работе YOLOinfected (рис. 1, 2). Из 6188 изображений всего 58 попали не в 1й кластер.

Это может быть связано с тем, что использованные нами модели не подходят для таких задач (как вариант, у нас слишком маленькая выборка, ведь в оригинальных исследованиях от Facebook AI Research размер выборок вариировался от 1 млн до 1 млрд изображений, что на несколько порядков больше наших нескольких тысяч), а также с тем, что у нас крайне малый опыт использования моделей с самообучением.

Видно, что применение методов машинного обучения - очень сложная и объемная задача. Однако данное направление дальнейших исследований таит за собой огромный потенциал, возможно имеет смысл увеличить выборку или написать модель, более подходящую для работы с сравнительно малыми объемами данных.

В результате обучения SwAV на нашей выборке не было получено четкой и эффективной кластеризации, однако внутренняя кластеризация SwAV дает интересный результат, требующий дальнейшего изучения. 70 кластеров, при обработке каким-либо еще методом, действительно могут соответствовать каким-либо реальным различиям, однако у нас нет методов для оценки этого.

Исходя из того, что несколько разных (при чем и принципиально и по количеству кластеров) методов дали достоверное разделение на кластеры, логично предположить, что действительно, четкого и однозначного разделения на морфотипы не существует, однако предложенные варианты деления на 6 морфотипов обоснованны (у Harutyunyan et. al. (2015) было так же 6 кластеров; метод, определяющий число кластеров автоматически, также обнаружил 6 кластеров) и достаточно схожи между собой (хоть и номера полученных кластеров могут не совпадать).

Ни одна из классификаций, полученных нами на измеренных вручную, которые можно было бы рассматривать, как легко применимые и отвечающие нашим запросам, не дает возможности выделить зрительно отличимые паразиты. Действительно, есть некоторые размерные границы, однако они очень нечеткие и неясно как определить вклад того или иного из изначальных 9 измеренных признаков в итоговые параметры.

Различия между полученными морфотипами не соответствуют таковым, приведенным у Narutyunyan et. al. (2015) - скорее всего из-за того, что те параметры, которые мы измеряли у различных частей зараженного эритроцита не соответствуют тем, которые являлись отличительными чертами для морфотипов Narutyunyan et. al.. Подробное рассмотрение свойств, использованных Narutyunyan et. al. (2015) является перспективным направлением дальнейшей работы. Возможно, следует учесть качественные характеристики (таких как, например, наличие вытянутого “хвоста” у паразитиформной вакуоли, которые учитывали Narutyunyan et. al. (2015)), однако неясно как это делать.

Если сравнивать полученные нами морфотипы с таковыми у Tome et. al. (2019), то тоже нельзя найти много сходств, однако их признаки будут ближе к нашим.

Вероятнее всего такой результат объясняется тем, что данные, которые мы считывали с зараженных эритроцитов, мало отражают различные свойства паразитиформных вакуолей, связанные с их формой. Это требует доработки и дальнейшего исследования.

Использование различных нейросетевых моделей - перспективный и недорогой метод для таких задач, однако его эффективность и биологическая значимость пока под вопросом.

ВЫВОДЫ

1. Ни одна полученная нами статистически значимая классификация зараженных эритроцитов не соответствует с таковой у Аракелян.
2. Нейросети - эффективный метод для обработки сравнительно больших выборок изображений, однако неясно как трактовать их результат.
3. Не выделено новой классификации паразитиформных вакуолей и зараженных эритроцитов, имеющей статистическую значимость.

БЛАГОДАРНОСТИ

Мы благодарны Сергею Менделевичу Глаголеву за организацию практической деятельности старшеклассников и О. Д. Николаеву за руководство нашей работой. Также хотелось бы поблагодарить лабораторию сравнительной этологии и биокommunikации за возможность проведения практики в институте проблем экологии эволюции им. А.Н. Северцова РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Даревский И.С., Скальные ящерицы Кавказа: Систематика, экология и филогения полиморфной группы кавказских ящериц подрода *Archaeolacerta* Л.: «Наука» 1967 235 с.
2. Созоник Е.С.. "Исследование проведения лабораторного анализа крови на содержание лейкоцитов с использованием нейросетевых технологий и систем распознавания образов" Вестник науки, 2024 4(73): 2024 655-663.
3. Alam M.M., Islam M.T., Machine learning approach of automatic identification and counting of blood cells, *Healthcare technology letters*. 2019 4: 103–108

4. Arakelyan, M., Harutyunyan, T., Aghayan, S. A., & Carretero, M. A. . Infection of parthenogenetic lizards by blood parasites does not support the “Red Queen hypothesis” but reveals the costs of sex. *Zoology*, 2019 136, 125709
5. Arribas O.J., Phylogeny and relationships of the mountain lizards of Europe and Near East (*Archaeolacerta* Mertens, 1921, sensu lato) and their relationships among the Eurasian lacertid radiation. *Russian Journal of Herpetology*, 1999, 6(1), 1-22.
6. Baneth G., Samish M., Shkap V., Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). *Journal of Parasitology*, 2007, 93(2), 283-299.
7. Beyer, T.V. Cytochemical studies on the haemogregarines of Armenian reptiles I. DNA in the nuclei of some Karyolysis species from the rock-lizards *Lacerta aremeniaca* and *Lacerta saxicola*. *Acta protozool* 1986 6: 79-86
8. Beyer T.V., Svezhova N.V., Radchenko A.I., Sidorenko, N.V. Parasitophorous vacuole: morphofunctional diversity in different coccidian genera (a short insight into the problem), *Cell Biology International*, 2002; 26, 861–871
9. Bouma M.J., Smallridge C.J., Bull C.M., Komdeur J., Susceptibility to infection by a haemogregarine parasite and the impact of infection in the Australian sleepy lizard *Tiliqua rugosa*. *Parasitology research*, 2007, 100, 949-954.
10. Caron M., Touvron H., Misra I., Jégou H., Mairal J., Bojanowski P., Joulin A., Emerging Properties in Self-Supervised Vision Transformers. *Proceedings of the International Conference on Computer Vision (ICCV)*, 2021, 9630-9640.
11. Ester M, Kriegel H-P, Sander J, Xu X, others. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. *In: kdd. 1996. p. 226–31.*,
12. Harris, C.R. et al. Array programming with NumPy. *Nature* 2020, 585, 357–362
13. Harutyunyan T.K., Danielyan F.D., Arakelyan M.S., Blood parasites morphotypes of rock lizards of Armenia. *Proceedings of the YSU B: Chemical and Biological Sciences*, 2015, 49(2 (237)), 45-49.
14. Manwell R.D., Gregarines and haemogregarines. *Parasitic protozoa*, 1977, 3, 1-32.
15. Moreira I. (2013). *Fitness effects of Hepatozoon blood parasites in selected lizard species*
16. Nassar M., Doan M., Filby A., Wolkenhauer O., Fogg D.K., Piasecka J., Thornton C.A., Carpenter A.E., Summers H.D., Rees P. Label-free identification of white blood cells using machine learning. *Cytometry Part A* 2019; 95: 836–842.
17. Oppliger A., Celerier M.L., Clobert J., Physiological and behaviour changes in common lizards parasitized by haemogregarines. *Parasitol.*, 1996 113, 433–438.
18. Orlova M.V., Doronin I.V., Doronina M.A., Anisimov N.V.. A review of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) associated with *Lacerta* spp.(Reptilia: Lacertidae) from the Caucasus and adjacent territory. *Diversity*, 2022, 15(9), 1026.
19. Petrosyan VG, Osipov FA, Bobrov VV, Dergunova NN, Kropachev I et al. . New records and geographic distribution of the sympatric zones of unisexual and bisexual rock

- lizards of the genus *Darevskia* in Armenia and adjacent territories. Biodivers Data J. 2022, 8: e56030.
20. Smith T.G., The genus Hepatozoon (apicomplexa: adeleina). The Journal of parasitology, 1996, 565-585.
 21. Sthle L., Wold S., Multivariate analysis of variance (MANOVA), Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, ISSN 0169-7439, 1990, Vol. 9 is. 2, 127-141
 22. Tarkhnishvili D, Gabelaia M, Adriaens D, 2020. Phenotypic divergence, convergence and evolution of Caucasian rock lizards (*Darevskia*). Biol J Linn Soc 2019, 101: 447–460.
 23. Tessema A.W., Mohammed M.A., Simegn G.L., Kwa T.C. Quantitative analysis of blood cells from microscopic images using convolutional neural network. Med Biol Eng Comput 2021 59(1):143–152
 24. Tomé B., Pereira A., Harris D.J., Carretero M.A., Perera A. A paradise for parasites? Seven new haemogregarine species infecting lizards from the Canary Islands. Parasitology 1–12.
 25. Uetz P., Hošek J. (Eds.), 2019. The Reptile Database. <http://www.reptile-database.org> (accessed 11 February 2019).
 26. Umesh P. Image processing in python. CSI Communications 2012, 23
 27. Varadi M., Bordin N., Orengo C., Velankar S. The opportunities and challenges posed by the new generation of deep learning-based protein structure predictors. Curr. Opin. Struct. Biol. 2023; 79: 102-543.
 28. Van As M., Netherlands E.C., Smit N.J., Molecular characterisation and morphological description of two new species of Hepatozoon Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) infecting leukocytes of African leopards *Panthera pardus pardus* (L.). Parasites & Vectors, 2020, 13, 1-16.
 29. Van As M., Netherlands E.C., Van As J., Cook C.A., Smit N.J., Life cycle stages of Hepatozoon ingwe (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in an Ixodes sp. tick vector (Arthropoda: Ixodida: Ixodidae) and an African leopard *Panthera pardus pardus*. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 26, 101049 (2025).
 30. Wozniak, E. J., Kazacos, K. R., Telford, S. R., Jr., & McLaughlin, G. L. . Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with Hepatozoon mocassini infections in unnatural reptilian hosts. International Journal for Parasitology, 1996 26: 141–146.
 31. Wu J., Advances in K-means clustering: a data mining thinking. Springer Science & Business Media; 2012.
 32. Weinfurt, K. P.. Multivariate analysis of variance. In L.G. Grimm, P.R. Yarnold (Eds.), Reading and understanding multivariate statistics American Psychological Association, 1995, (pp. 245–276).

33. Ester M., Kriegel H.-P., Sander J., Xu X. A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. In: Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining (KDD'96), 1996, pp. 226–231.
34. Fisher R.A. The comparison of samples with possibly unequal variances. *Annals of Eugenics*, 1936, 9(2), 174–180.