

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 595.122

© 1990 г.

К.В. ГАЛАКТИОНОВ, И.И. МАЛКОВА

УЛЬТРАСТРУКТУРА И ФОРМИРОВАНИЕ СТИЛЕТА ЦЕРКАРИЙ
МИКРОФАЛЛИДНЫХ ТРЕМАТОД (PLAGIORCHNIDA, MICROPHALLIDAE)

Обширные группы личинок трематод - *Xiphidiocercaria* и *Ophthamoxiphidiocercaria* обладают стилетом. Согласно данным световой микроскопии, он представляет собой конусовидное или копьевидное образование, погруженное своим основанием в ткани ротовой присоски (Гинецинская, 1968). Стиллет подвижен и используется внедряющейся церкарией для разрезания тканей второго промежуточного хозяина. Ультраструктура стилета кратко описана в двух работах (Кфие, 1971; Gibson, 1974), однако детально не исследовалась. Ниже, на основании материала по церкариям микрофаллидных трематод, мы попытаемся более подробно осветить этот вопрос, а также проследить этапы формирования стилета в ходе морфогенеза личинки.

Моллюски *Hydrobia ulvae*, зараженные партенитами микрофаллид, были собраны летом 1986 г. в Онежском и летом 1987 г. в Кандалакшском заливах Белого моря. Спороцист, содержащих зрелые церкарии *Maritrema subdolum* Jagerskiold, *Microphallus claviformis* Brandes и *Levinseniella brachysoma* Jagerskiold, вырезали вместе с окружающей тканью из висцерального мешка моллюсков и фиксировали 3%-ным раствором глютарового альдегида в течение 1—2 ч при комнатной температуре. Затем следовали промывка в двух порциях 0,1 М фосфатного буфера (рН 7,4), дофиксация в течение 1-2 ч 1%-ным водным раствором тетраоксида осмия и снова промывка в буфере. Осмолярность всех рабочих растворов доводили примерно до 760 мосмолей добавлением сахарозы. После обезвоживания в спиртах и ацетоне материал заливали в аралдит. Срезы изготавливали на ультратоме LKB-III и окрашивали последовательно цитратом свинца по Рейнольдсу и насыщенным спиртовым раствором уранилацетата. Срезы просматривали на электронных микроскопах JEM 100 В и JEM 1200 EX.

Светооптическое изучение строения стилетов церкарий проводили на прижизненных препаратах с использованием фазово-контрастного устройства КФ-4. Кроме личинок вышеперечисленных видов, исследовали также церкарии *Maritrema murmanica* Galaktionov и *Microphallus* sp., выделенные из зараженных моллюсков *Littorina saxatilis* Olivi Баренцева моря.

При наблюдении в световой микроскоп в стилете церкарий микрофаллид отчетливо просматриваются два слоя: прозрачный внутренний и тонкий светопреломляющий наружный (рис. 1, *а-д*). Последний либо окружает весь стилет (рис. 1, *а*) либо оставляет свободной его заднюю часть (рис. 1, *б-д*). Во втором случае формируется более или менее выраженная рукоятка, состоящая только из внутреннего слоя. Светопреломляющий слой стилета может образовывать боковые выросты, так называемые режущие крылья (рис. 1, *а, б, г*), характерные для аналогичных образований многих ксифидио- и офтальмоксифидиоцеркарий (Гинецинская, 1968).

Два описанных слоя стилета отчетливо различаются и на ультраструктурном уровне (рис. 2; 3, 1, 3, 4). Внутренний образован материалом высокой электронной плотности, который кажется гомогенным, но на ряде электроннограмм показывает кристаллическую структуру (рис. 3, 1А). Наружный слой настолько плотный, что плохо пропитывается смолой и частично выкрашивается при резке. Стиллет локализуется в кармане, образованном инвагинацией тегумента терминальной части ротовой присоски. Он погружен внутрь синцитиальной выстилки дна кармана и своим основанием вплотную прилежит к ее базальной мембране. Передняя часть стилета (0,5-0,75 длины) ограничивается только наружной плазматической мембраной (рис. 3, 7).

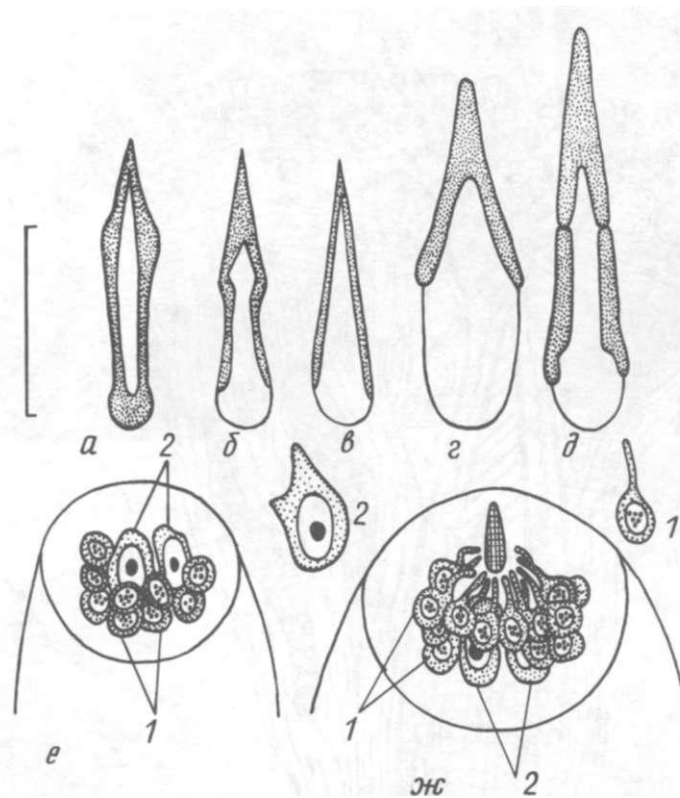


Рис. 1. Строение и этапы формирования стилета микрофаллидных церкарий: а - *Maritrema subdolum*; б - *M. murmanica*; в - *Microphallus claviformis*; г - *Microphallus* sp.; д - *Levinseniella brachysoma*; е, ж - ротовая присоска развивающейся микрофаллидной церкарии на двух последовательных стадиях морфогенеза (1 - мелкие железистые клетки, 2 - крупные железистые клетки). Масштаб 10 мкм

Таким образом, ультраструктурные данные отчетливо указывают, что стилет церкарий представляет собой сильно разросшийся шип тегумента. От типичного шипа, кроме размеров, его отличает наличие внешнего плотного слоя. К такому же выводу относительно природы стилета ранее пришла Коие (Kóie, 1971) при исследовании тонкой морфологии церкарий *Zoogonoides viviparus* Odhner. Аналогичная структура стилета отображена и на электроннограммах, помещенных в работе Гибсона (Gibson, 1974, рис. 13, стр. 246), хотя в тексте это образование не описывается.

В апикальной части кармана стилета церкарий микрофаллид тегументальная пластинка толстая и сохраняет органеллы и секреторные гранулы, специфичные для тегумента ротовой присоски личинки данного вида (рис. 2; 3,2). По мере продвижения внутрь инвагинации ширина синцитиального слоя уменьшается, исчезают секреторные гранулы. Органеллы достоверно не выявляются, но отмечаются пузырьковидные включения неясной природы. Поверхность выстилки, обращенная в полость кармана, образует неправильной формы выросты.

Базальная мембрана синцитиального слоя подстилается базальной пластинкой, которая является непосредственным продолжением аналогичной структуры тегумента ротовой присоски. В районе дна кармана, ниже его, наблюдается довольно толстый слой фиброзного материала средней электронной плотности (рис. 3, 3, 4). По-видимому, его составляют промежуточные филаменты, которые в исследованиях последних лет были обнаружены под базальной пластинкой тегумента трематод и цестод (Abbas, Cain, 1987; Fukuda et al., 1987; Holy, Oaks, 1987). Им приписывается роль интеграторов наружной синцитиальной пластинки и мускулатуры кожно-мышечного мешка. У марит *Schistosoma mansoni* Sambon утолщения слоя промежуточных филаментов выявляются в районе основания шипов (Abbas, Cain, 1987). Авторы работы предполагают, что с их помощью обеспечивается функциональное объединение шипов с подлежащими мускульными волокнами. Ту же роль, очевидно, играет и обнаруженный нами фиброзный слой: на электроннограммах отчетливо видно, что к нему при помощи многочисленных крупных плотных тел присоединяются пучки гладких мышц, обеспечивающих подвижность стилета (рис. 3, 3,4).

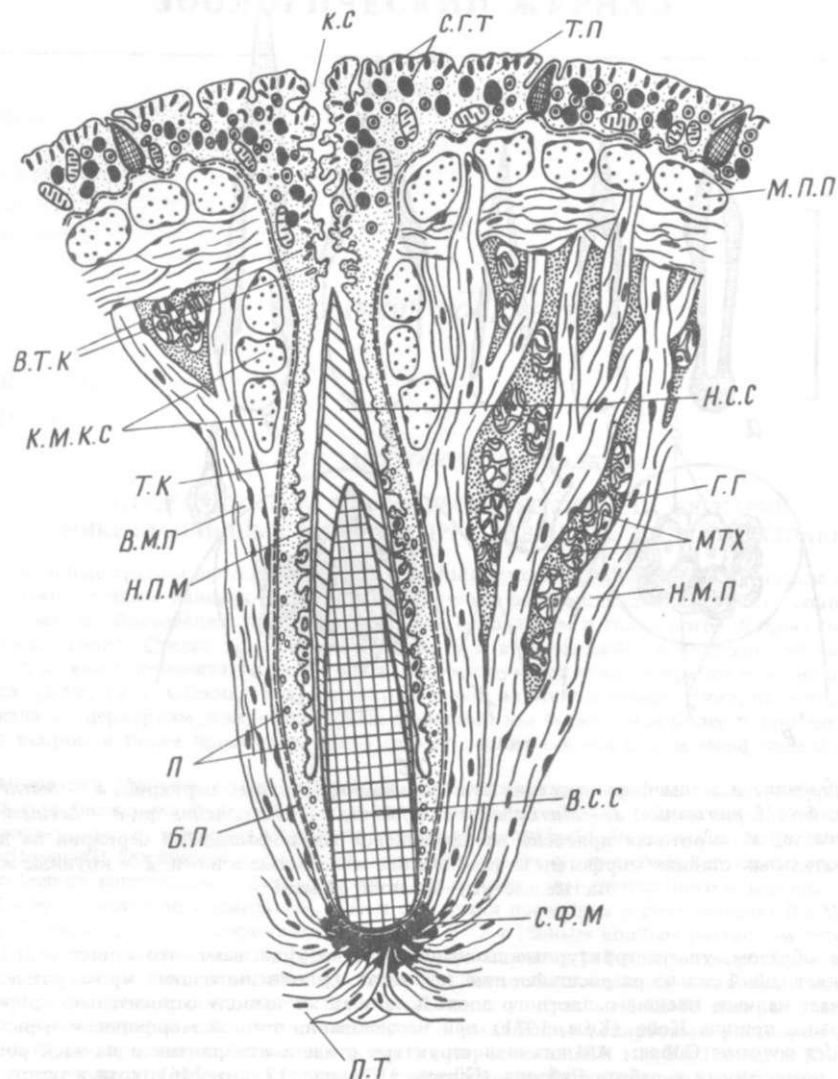


Рис. 2. Схема строения стилета микрофаллидных церкарий по данным электронно-микроскопического исследования. Пояснения в тексте

Каждый мышечный пучок окружен плазматической мембраной, содержит тонкие и толстые филаменты, многочисленные гранулы гликогена и среднего размера митохондрии с трубчатыми кристами и светлым матриксом (рис. 3, 5). Вокруг одного толстого филамента располагаются 12 тонких. На всем протяжении мышечных пучков отмечаются плотные тела, которые, однако, значительно мельче, чем таковые в месте прикрепления мышц к фиброному слою у основания стилета. Мышечные пучки идут вдоль кармана стилета параллельно или под небольшим острым углом к нему. Примерно на уровне середины стилета наружные пучки веерообразно расходятся, дробятся на более мелкие, которые при помощи полудесмосом соединяются с поверхностной мускулатурой ротовой присоски (рис. 3,5). Внутренние пучки мышц вплотную прилегают к базальной пластинке кармана стилета и образуют с ней контакты по типу полудесмосом¹. Они уходят в сторону только на уровне передней трети или даже острия стилета. До этого места горло кармана опоясывается пучками кольцевых

¹ По-видимому, мышечные пучки контактируют не с базальной пластинкой, а с подстилающим ее слоем промежуточных филаментов, который, однако, здесь очень тонкий и не выявляется на наших электроннограммах.

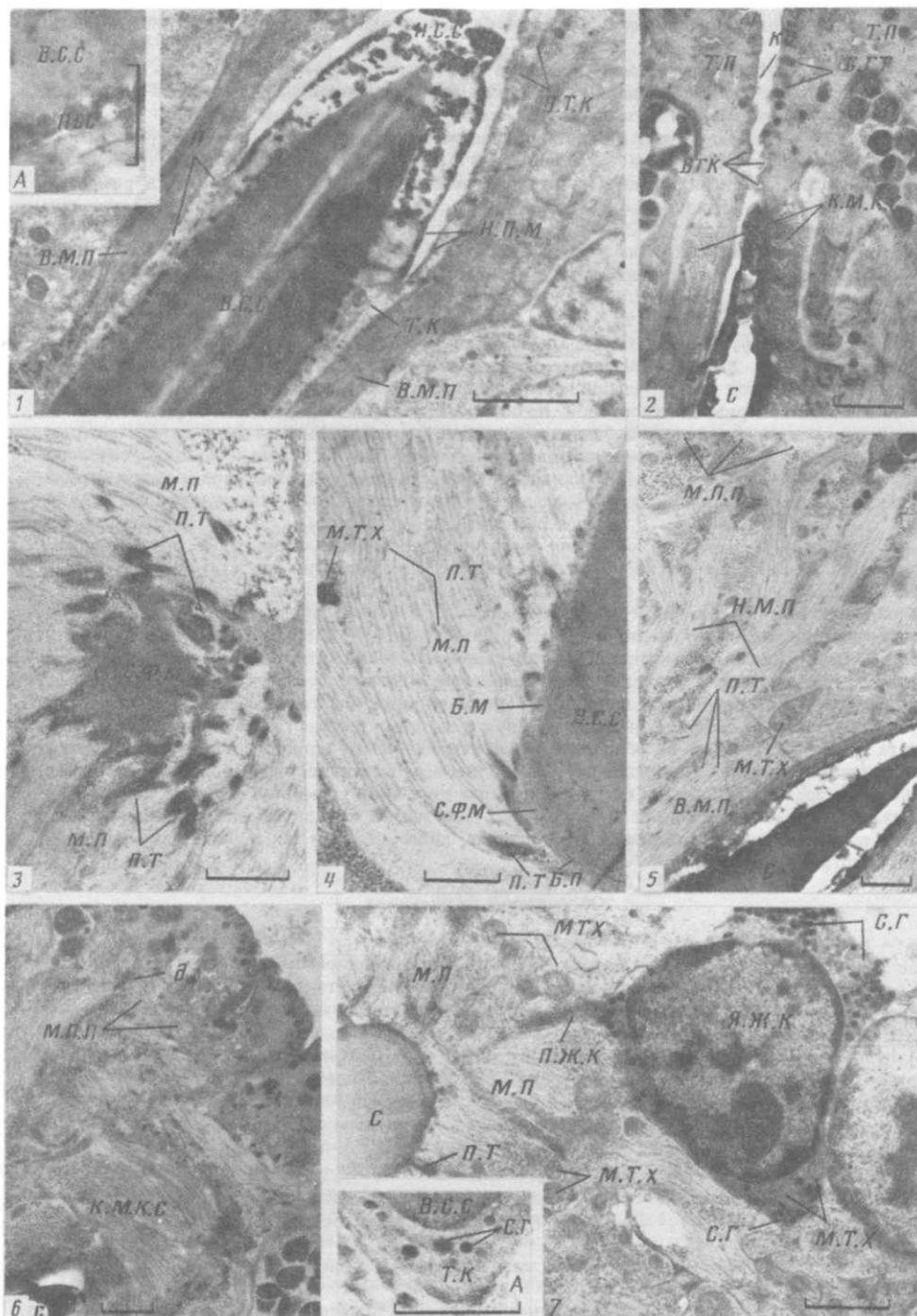


Рис. 3. Ультраструктурное строение стилета микрофаллидных церкарий: 1 - продольный срез стилета зрелой церкарии *Levinseniella brachysoma*, X 12 667; 1А - кристаллическая структура внутреннего слоя стилета *Maritrema subdolum*, X 20 000; 2 - карман стилета церкарии *Microphallus claviformis* (продольный срез), X 13 818; 3 - основание стилета церкарии *M. claviformis*, X 15 360; 4 - основание стилета церкарии *M. claviformis* (продольный срез) X 14 667; 5 - мускулатура стилета церкарии *M. claviformis* X 10 000; 6 - мускулатура кармана стилета церкарии *M. claviformis*, X 10 000; 7 - секреторная клетка присоски церкарии *M. claviformis*, X 16 071; 7А - формирование стилета церкарии *Maritrema subdolum*, X 24 000. Масштаб 1 мкм. Обозначения как на рис. 2

гладких мышц, которые также соединяются с базальной пластинкой благодаря полудесмосомам (рис. 3, б).

Самые ранние этапы формирования стилета на электроннограммах проследить не удалось. Светооптически он впервые выявляется в виде маленького продолговатого тела из аморфного материала на стадии морфогенеза церкарии, которая характеризуется отчетливо обособленным хвостовым зачатком и только что прошедшим вторым делением клеток мерцательного пламени (эксcretорная формула: $2 [(1+1) + (1+1)] = 8$) (Галактионов, 1986) (рис. 1, ж). При дальнейшем развитии личинки зачаток стилета постепенно увеличивается в размерах. На электроннограммах видно, что в этот период он состоит из электронно-плотного материала с выраженной кристаллической структурой - будущий внутренний слой (рис. 3, 7А). Зачаток полностью погружен в синцитиальную пластинку тегумента, которая вместе с ним уже инвагинировала в глубь ротовой присоски. Рост стилета, очевидно, осуществляется в результате уплотнения актиновых филаментов, т.е. так, как это описано для шипов тегумента трематод (Cohen et al., 1982; Abbas, Cain, 1987).

Формирование наружного слоя стилета, по-видимому, связано с секреторной активностью специализированных субтегументальных желез. Они появляются в виде двух крупных и группы мелких клеток в центральной части зачатка ротовой присоски вскоре после обособления у эмбриона церкарии хвостовой почки (эксcretорная формула: $2 [(1)+(1)] = 4$) (рис. 1, ж). Клетки чрезвычайно бедны цитоплазмой и в дальнейшем формируют протоки, которые видны на пределе разрешения светового микроскопа и направлены в сторону основания развивающегося стилета. Накапливающийся в железах секрет окрашивается в сиреневый цвет азокармином, фиолетовый - альтиановым синим и паральдегид-тионином, малиновый - паральдегид-фуксином и не дает реакции с бромфеноловым синим. На завершающих этапах морфогенеза церкарии оба типа железистых образований исчезают, что совпадает по времени с возникновением наружного светопреломляющего слоя стилета.

На электроннограммах нами были найдены только мелкие железистые клетки (рис. 3, 7). Они имеют полигональную форму, причем практически весь объем клетки занимает ядро с одним конденсированным ядрышком и электронно-плотной нуклеоплазмой с гетерохроматинными включениями. Узкий ободок электронно-плотной цитоплазмы забит мелкими (0,1 мкм в диаметре) осмиофильными секреторными гранулами, содержит шероховатый эндоплазматический ретикулум и овальные митохондрии с пластинчатыми кристами. Секрет по тонким протокам поступает в синцитиальную пластинку тегумента, облегающую основание стилета (рис. 3, 7А). Здесь он обнаруживается в течение всего периода построения наружного слоя стилета, принимая, по-видимому, самое непосредственное участие в этом процессе, и исчезает у зрелых церкарий. Секреторные включения иной упаковки, которые можно было бы интерпретировать как секрет двух крупных железистых клеток, в выстилке кармана стилета не обнаружены. Он либо сюда не поступает, либо упакован так же, как секрет мелких субтегументальных желез.

Обозначения на рисунках

б.м - базальная мембрана, *б.п* - базальная пластинка, *в.м.п* - внешние мышечные пучки, *в.с.с* - внутренний слой стилета, *в.т.к* - выросты тегумента кармана, *г.г* - гранулы гликогена, *д* - десмосомы, *к.м.к.с* - кольцевые мышцы кармана стилета, *к.с* - карман стилета, *м.п* - мышечный пучок, *м.п.п* - мышечные пучки присоски, *мтх* - митохондрии, *н.м.п* - наружные мышечные пучки, *н.п.м* - наружная плазматическая мембрана, *н.с.с* - наружный слой стилета, *п* - пузырьки, *п.ж.к* - проток железистой клетки, *п.т* - плотные тела, *с* - стилет, *с.г* - секреторные гранулы, *с.г.т* - секреторные гранулы тегумента, *с.ф.м* - слой фиброзного материала, *т.к* - тегумент кармана, *т.п* - тегумент присоски, *я.ж.к* - ядро железистой клетки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Галактионов КВ., 1986. Эволюция морфогенеза гермафродитного поколения трематод семейства Microphallidae // Паразиты и болезни водных беспозвоночных (Тезисы докл. IV Всес. симп., М., 1986), 30-31.
- Гинецинская Т.А., 1968. Трематоды: их жизненные циклы, биология и эволюция. Л.: Наука, 1-411.
- Abbas M.K., Cain G.D., 1987. Action and intermediate-sized filaments of the spines and cytoskeleton of *Schistosoma mansoni* // Parasitol. Res., 73,1, 66-74.
- Cohen C., Reinhardt B., Castellani L., Norton P., Stihewalt M., 1982. Schistosome surface spines are "crystals" of actin // J. Cell Biol., 95, 3, 987-988.
- Fukuda K., Fujino T., Hirata M., 1987. Ultrastructural characterization of tegumental spines of the adult lung fluke, *Paragonimus westermani* // Z. Parasitenk., 73,1, 95-97.
- Gibson D.J., 1974. Aspects of the ultrastructure of the daughter sporocyst and cercaria of *Podocotyle staffordi* Miller, 1941 (Digenea: Opcoelidae) // Norw. J. Zool., 22, 4, 237-252.
- Holy J.M., Oaks J.A., 1987. Mechanical integration of muscle, tegument and subtegumental tissues by 134

anchoring fibrils and microfibrils in the cestode *Hymenolepis diminuta* // Tissue and cell, 19, 6, 881-891.
№ M., 1971. On the histochemistry and ultrastructure of the tegument and associated structures of the cercaria of *Zoogonoides viviparus* in the first intermediate host // Ophelia, 9, 1, 165-206.

Мурманский морской
биологический институт

Поступила в редакцию
13 января 1989 г.

ULTRASTRUCTURE AND FORMATION OF STYLET IN MICROPHALLID
TREMATODES CERCARIA (PLAGIORCHIIDA, MICROPHALLI DAE)

K.V. GALAKTIONOV, I.I. MALKOVA

Murmansk Marine Biology Institute, Kola Division, USSR Academy of Sciences, Dalniye Zelentsy

S u m m a r y

The stylet formation in cercaria of five microphallid species is studied: *Maritrema subdolum*, *Microphallus claviformes*, and *Levinseniella brachysoma* from mollusc *Hydrobia ulvae* (the White Sea), *Maritrema murmanica* and *Microphallus* sp. from *Littorina saxatilis* (the Barents Sea). On electronograms the stylet has a bilayered structure. It is located in the pocket formed by the invagination of oral sucker tegument. The stylet is immersed into the syncytial lining of the pocket bottom, its fore-part is only limited by the outer plasma membrane. The layer of fibrous material (probably intermediate filaments) is detected under the basal lamina in the region of stylet basement. Bundles of smooth muscles are attached to its foundation by dense bodies. First they stretch along the stylet basement, then diverge in a fan-shape manner and contact with the muscles of the body wall. The inner stylet layer is supposed to be the expanded tegumental spine. The outer layer is formed by the secret of special glands which are found at oral sucker of the cercaria formed.