

УЛЬТРАСТРУКТУРА ТРОФАМНИОНА
POLYPODIUM HYDRIFORME USSOV
(COELENTERATA) НА ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫХ ЭТАПАХ
ЕГО ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ

Е. В. Райкова

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

На основании ультраструктурного исследования трофической оболочки (трофамниона) вокруг столона *Polypodium* в осенних и весенних ооцитах стерляди и осетра показано, что она представляет собой одну огромную, полную внутри клетку, выстилающую паразитофорную вакуоль. На стадии столона цитоплазма трофамниона сильнее заполнена пищевым материалом, чем на стадии личинки, имеет более развитые выросты, обращенные к желтку, а на внутренней стороне местами несет анастомозирующие микроворсинки, образующие подобие сита. Максимальной трофической активности трофамнион достигает в августе—октябре в ооцитах IV стадии зрелости, где идет интенсивный вителлогенез. Ко времени нереста осетровых (в мае) трофамнион дегенерирует. Описывается ультраструктура дегенерирующего трофамниона: пикнотизация ядер, мембранное перерождение цитоплазмы.

Polypodium hydriforme — кишечнорастворимое, паразитирующее в ооцитах осетровых рыб и открытое в 1871 г. на Волге академиком Ф. В. Овсянниковым, интенсивно изучалось вплоть до 1925 г. М. М. Усовым, С. А. Гриммом и А. Н. Липиным. После 1925 г., со времени последней статьи Липина (1925), интерес к нему как-то угас. И только В. А. Догель в 1940, а затем в 1945 и 1954 гг. настойчиво ставил вопрос о возобновлении исследований *Polypodium* в связи с данными о появлении его в новых водоемах и новых хозяевах (Догель, 1940, 1945, 1954). При этом Догель в первую очередь подчеркивал практическую важность изучения биологии *Polypodium*: «Особенно угрожающим является то обстоятельство, что *Polypodium* есть паразит икры, т. е. органов размножения, а потому при сильной инвазии может привести к кастрации самок осетровых. Вот почему мы считаем своим долгом поднять сигнал тревоги и призвать к исследованию поднятого нами вопроса» (Догель, 1940, с. 323).

Автору настоящей статьи посчастливилось быть тем аспирантом ГосНИОРХ, которому Догель доверил интересовавшую его тему — дальнейшее исследование жизненного цикла *Polypodium*.

Предлагаемая статья посвящена ультраструктуре трофамниона полиподия — не известного ранее для кишечнорастворимых уникального приспособления к паразитизму. Данные по ультраструктуре трофамниона на ранней (планулообразной) стадии развития полиподия уже опубликованы (Райкова, 1980а, 1980б). В настоящей статье внимание уделяется ультраструктуре трофамниона в разгаре и в конце его функционирования — на стадии паразитического столона.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал собирали на Волге, в 90 км выше Астрахани (тоня Мужичья) в разные годы (в августе—октябре и в мае). Зараженные полиподием икринки стерляди и осетра фиксировали 2—3 ч 2.5%-ным глутаральдегидом на фосфатном буфере на льду, затем промывали тем же буфером и дофиксировали OsO_4 , по Колфилду. Часть материала фиксировали только осмием в смеси Колфилда. После обезвоживания в ацетоне икринки заливали в аралдит. Из них

приготавливали срезы на ультрамикротоме Рейхерта OM U2; срезы контрастировали 4 ч водным насыщенным раствором уранил-ацетата, а затем 10—20 мин цитратом свинца. Срезы исследовали в электронном микроскопе JEM-7A. Использован материал от 4 самок стерляди и 4 самок осетра, зафиксированный в августе, конце сентября, начале октября и в конце мая.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уже со времени первых работ Липина (1908, 1911) *Polypodium* стал знаменит благодаря своему удивительному приспособлению к паразитированию внутри икринок осетровых рыб, выражающемуся в извращении положения зародышевых пластов. Действительно, на значительной по протяженности фазе жизненного цикла — от личинки до выходящего в воду столона со щупальцами (сроком около года) — *Polypodium* как бы вывернут наизнанку, т. е. обращен пищеварительным слоем клеток — энтодермой — к желтку, находящемуся снаружи от него. Эктодерма, т. е. в норме наружный слой клеток, занимает внутреннее положение и не соприкасается с желтком икринок. Этот факт логично повлек за собой представление о том, что энтодермальные клетки столона непосредственно поглощают желток. На самом деле оказалось, однако, что такое понимание справедливо лишь для самой последней стадии жизни паразита в икринке. На большей же части паразитической фазы цикла клетки энтодермы не контактируют непосредственно с желтком, потому что вокруг паразита в икринке есть специализированная оболочка, которую мы называли ранее капсулой (Райкова, 1958, 1960, 1973, 1980а), а позднее — трофамнионом (Райкова, 1980б). Как показано в наших последних работах, эта оболочка выполняет опорную, защитную и трофическую функции. Уже на стадии личинки она представляет собой единственную гигантскую полую внутри полиплоидную клетку (степень плоидности ее ядра значительно превышает 500 n), с лентовидным ветвящимся ядром. Клетка-трофамнион имеет гипертрофированную цитоплазму, заякоренную в желтке с помощью длинных выростов, а со стороны своей внутренней полости, где находится паразит, образует многочисленные микроворсинки. Таким образом, трофамнион выстилает паразитофорную вакуоль и служит для питания личинки (Райкова, 1958, 1980а, 1980б).

На стадии паразитического столона, интересующей нас в этой статье, трофамнион также хорошо выражен (рис. 1, 1) и местами сохраняется вплоть до весны (рис. 1, 2). Перед нерестом, при выворачивании столона эктодермой наружу, трофамнион окончательно разрывается и его фрагменты иногда еще видны на срезах между почками столона. После выхода столона из икринок наружу следы трофамниона окончательно теряются. Таким образом, на прослеживаемой стадии развития полиподия трофамнион вокруг столона с почками функционирует с августа по май. Паразиты находятся внутри ооцитов IV стадии зрелости. В осенних ооцитах (август—октябрь) это фаза интенсивного вителлогенеза; в майских ооцитах вителлогенез заканчивается (это преднерестовая стадия).

Нам не удалось обнаружить существенных различий в ультраструктуре трофамниона полиподия внутри икринок осетра и стерляди.

Трофамнион в осенних ооцитах. Как видно на рис. 1, столон паразита занимает периферическое положение в ооците. Ядро ооцита сохраняется, хотя и не представлено на рисунке. Под электронным микроскопом трофамнион на срезах имеет вид слоя (рис. 2, 1; см. вкл.) толщиной до 10 мкм, не разделенного на отдельные клетки и отделяющего паразитофорную вакуоль, в которой находится столон, от окружающего желтка икринок. В трофамнионе видны фрагменты лентовидного ядра, пищеварительные вакуоли, митохондрии. Как и на стадии личинки (Райкова, 1980а, 1980б), наружная сторона трофамниона несет обращенные в сторону желтка многочисленные выросты длиной 1—2 мкм, служащие для закрепления в желтке (рис. 2, 1) и для захвата питательного материала. С другой стороны, обращенной к столону, трофамнион несет микроворсинки длиной 1—2 мкм, которые погружены в содержимое паразитофорной вакуоли. В отличие от таковых на стадии личинки, микроворсинки трофамниона столона часто как бы склеены друг с другом (рис. 2, 1) и

на тангенциальных срезах имеют вид сита (рис. 2, 2). Все эти выросты снаружи и внутри сильно увеличивают как всасывающую, так и отдающую поверхности трофамниона. В толще трофамниона преобладают пищевые включения: цельные и полуразрушенные желточные пластинки, капли жира, пигментные зерна, иногда в самом тесном соседстве с ядром трофамниона; обычно эти включения лежат в вакуолях. Видна масса вакуолей с переваривающимся содержимым уже трудно определимого происхождения (рис. 2, 3). Среди этого обилия пищевых включений непросто отыскать органоиды цитоплазмы: аппарат Гольджи, микротрубочки, митохондрии. Митохондрии отличаются параллельным расположением крист, как и на стадии личинки. Рибосомы в цитоплазме видны

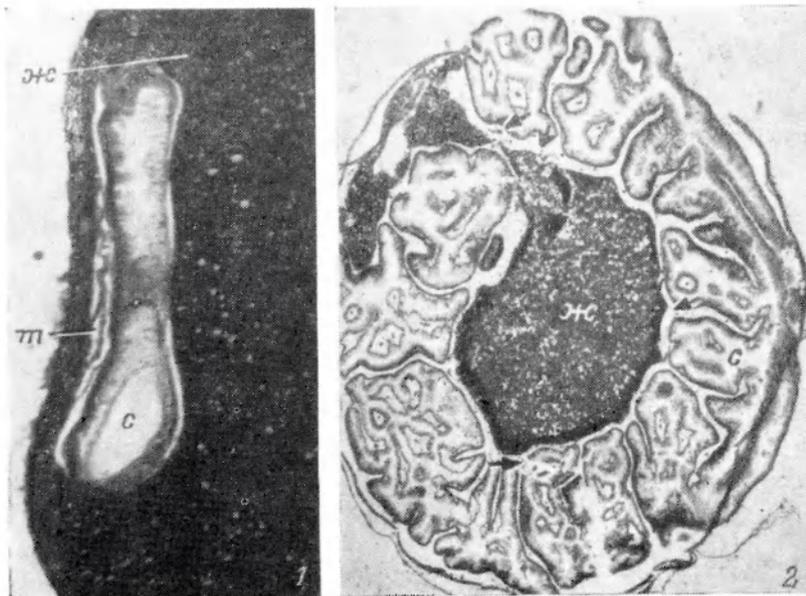


Рис. 1. Общий вид трофамниона в разгаре (1) и в конце (2) его функционирования.

1 — часть среза через зараженную икринку осетра в августе. Буэн, азан по Гейденгайну, 50 x; 2 — срез через зараженный ооцит осетра весной: видны остатки трофамниона в виде обрывков (стрелки) между центральной массой желтка и столоном паразита. Джилсон, азан по Гейденгайну, 30 x. Обозначения к рис. 1—3. *вт* — выросты трофамниона в сторону желтка ооцита, *жс* — желток, *зм* — завитки мембран, *к* — кристаллоид в ядре трофамниона, *м* — митохондрии, *мв* — микроворсинки, *пв* — паразитофорная вакуоль, *с* — столон паразита, *т* — трофамнион, *тв* — трофические включения в трофамнионе, *ф* — микрофибриллы, *цп* — цитоплазма ооцита, *я* — ядро трофамниона.

хуже, число их меньше; зато на стороне, обращенной к желтку, в основании выростов цитоплазмы трофамниона, значительно больше микрофиламентов. Как и на стадии личинки, зерна желтка, захваченные выростами трофамниона, в глубине его теряют свой матрикс (Райкова, 1980а, 1980б) и постепенно перевариваются внутри вакуолей (рис. 2, 3). Фрагменты ядра расположены ближе к внутренней стороне трофамниона, хроматин образует плотный слой по периферии ядра (рис. 2, 2, 3); на срезах ядра встречаются ядрышки фибриллярно-гранулярного строения и перихроматиновые гранулы. Клеточных границ внутри трофамниона не обнаружено.

Трофамнион в округ зрелых столонов в весенних ооцитах. В мае перед нерестом трофамнион обнаруживает признаки дегенерации. Его фрагменты едва видны на светооптических срезах (рис. 1, 2), следовательно, в большей части он разрушается. Под электронным микроскопом черты дегенерации сохранившихся фрагментов проступают еще более ясно: вся цитоплазма трофамниона становится вакуолизированной, изобилует мембранными профилями разной величины, и в ней уже трудно различить даже митохондрии (рис. 3, 1; см. вкл.). Ядро становится пикнотическим: хроматин расположен пристеночно, теряет свою обычную зернисто-нитчатую структуру. Местами в ядре просматриваются участки параллельно упакованных филаментов

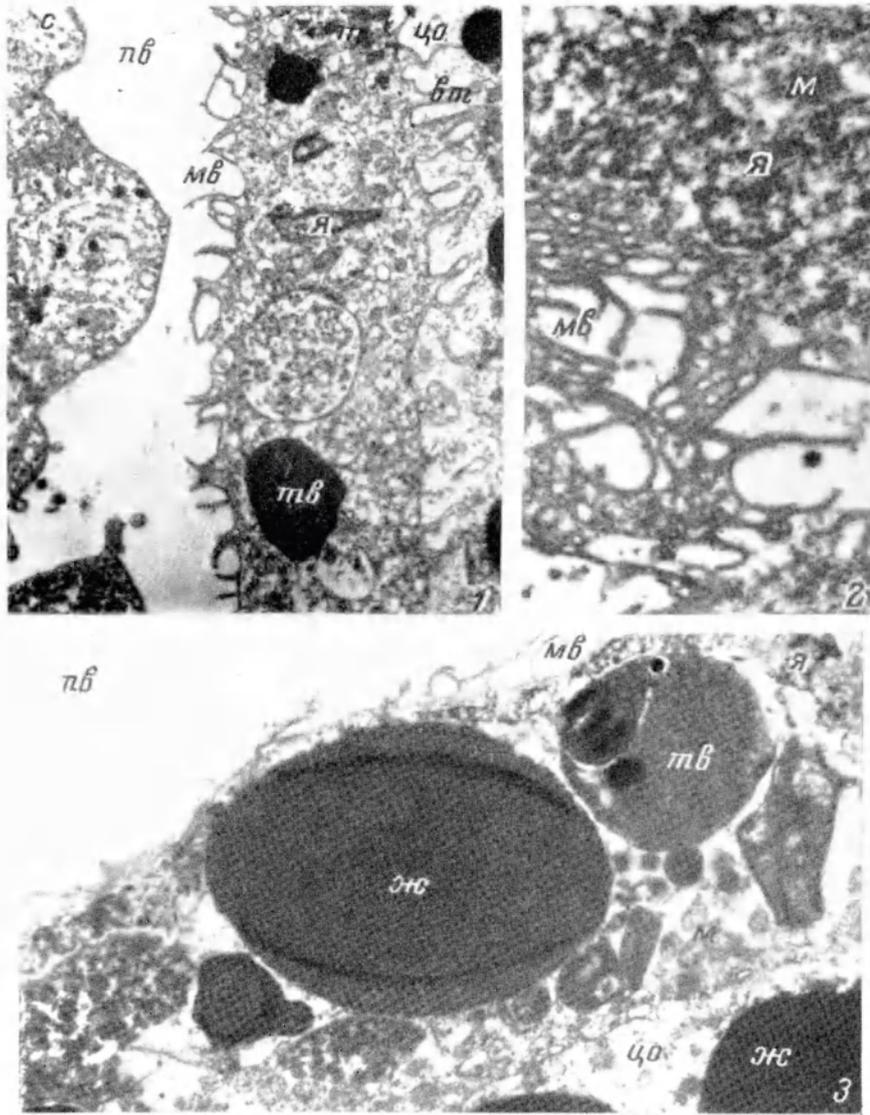


Рис. 2. Трофамнион в зараженных ооцитах стерляди в октябре. O_8O_4 .
1 — общий вид трофамниона под электронным микроскопом, 7000 \times ; 2 — трофамнион на тангенциальном срезе. Микроворсинки образуют род сита, 18 000 \times ; 3 — трофические включения в трофамнионе, 13 000 \times .

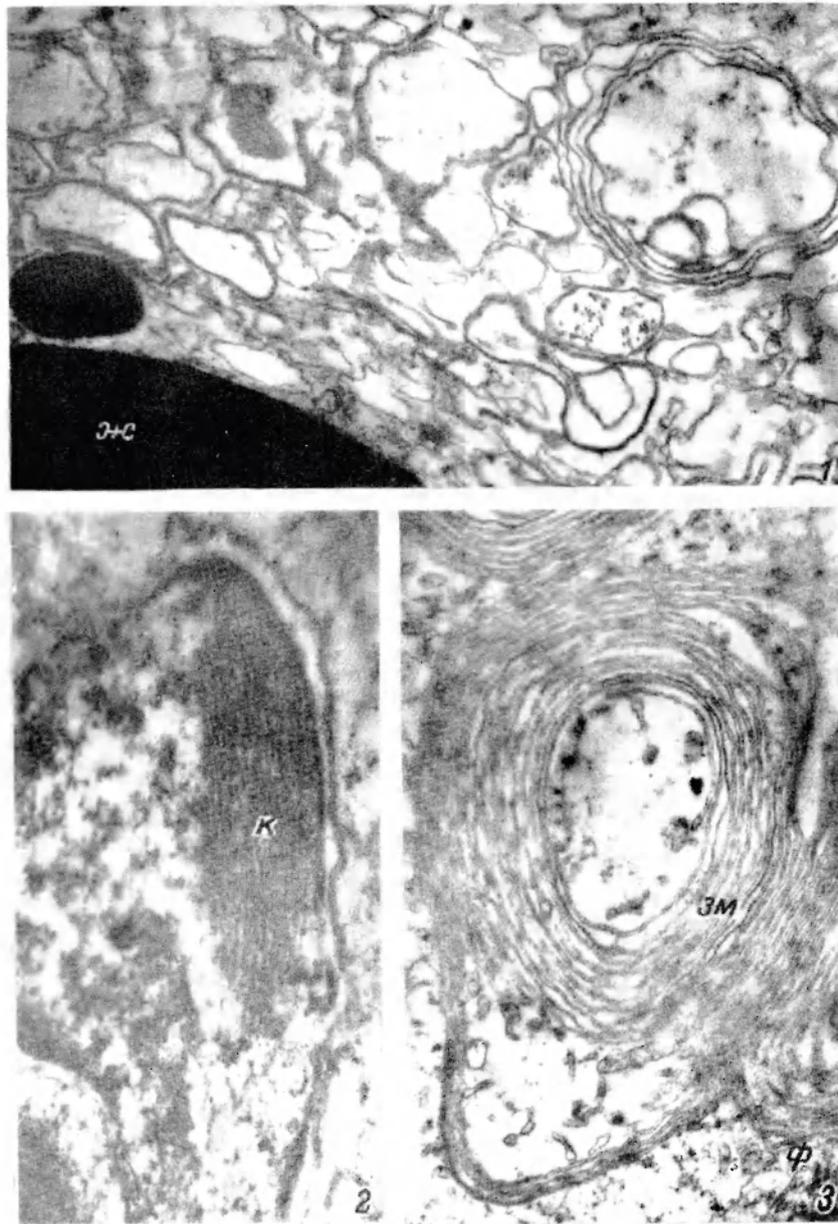


Рис. 3. Дегенерирующий трофамнион в ооцитах стерляди в мае. Глутаральдегид — O_6O_4 .
1 — мембранные профили в цитоплазме трофамниона, внизу слева — фрагмент желточного зерна, 13000 \times ;
2 — кристаллоид в ядре трофамниона, 46000 \times ; 3 — периферическая область дегенерирующего трофамниона
с кольцевидными мембранными профилями, 25000 \times .

типа фибриллярных кристаллоидов, напоминающие таковые в ядрах некоторых растительных клеток (Васильев, Гамалей, 1975); такой кристаллоид представлен на рис. 3, 2. Волокнистое перерождение испытывает и периферический (наружный) слой трофамниона: его выросты теперь подостланы слоем из коротких отрезков фибрилл (рис. 3, 3). Граничащая с трофамнионом зона цитоплазмы ооцита вся превратилась теперь в подобие миелиновых фигур, так что трудно сказать, образованы ли они выростами трофамниона или же представляют собой дегенерировавшую цитоплазму самого ооцита. Первое представляется нам более вероятным. Хотя на этой стадии клетки энтодермы столона уже и сами поглощают (фагоцитируют) желток, в области трофамниона все еще видны отдельные желточные пластинки (рис. 3, 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение ультраструктуры трофамниона на стадии личинки с таковой на стадии осеннего столона (с уже образовавшимися почками) показывает, что трофамнион на стадии столона, по-видимому, функционирует с максимальной трофической нагрузкой. Доказательством этому служит изобилие пищеварительных вакуолей, содержащих включения желтка и жира, в толще трофамниона. Таких включений здесь гораздо больше, чем в трофамнионе вокруг личинки.

Трофамнион на всех изученных стадиях сохраняет полярность: на его наружной стороне, обращенной к желтку, имеются выросты цитоплазмы, служащие для закрепления в желтке и для захвата пищевых частиц. На его внутренней стороне, обращенной к паразиту (точнее к паразитоформной вакуоли), образуются микроворсинки, увеличивающие поверхность трофамниона. На стадии столона ворсинки склеиваются и образуют род губки, через которую, по-видимому, продукты переваривания поступают в паразитоформную вакуоль и оттуда — к клеткам столона. Ядро в виде ветвящейся ленты, видимое на тонких срезах как ряд фрагментов, всегда располагается ближе к внутренней стороне трофамниона, несущей микроворсинки. На стадии столона с почками сильнее выражена волокнистость наружного края трофамниона, который обращен к желтку ооцита.

Основная функция трофамниона — пищеварительная. Это подтверждается как на световых, так и на электронно-микроскопических препаратах. Пищеварительные вакуоли, а также цистерны аппарата Гольджи и первичные лизосомы в цитоплазме трофамниона дают положительную реакцию на кислую фосфатазу (Райкова, 1980а, 1980б). Морфологические картины наличия пищевых частиц только в трофамнионе, а не в клетках самого столона (кроме самых поздних стадий развития последнего), непосредственно указывают на эту его функцию.

Пищевые частицы прослеживаются даже и в дегенерирующем трофамнионе — вокруг весенних, готовых к выворачиванию столонцов. Правда, на этой стадии сам трофамнион уже не составляет непрерывной оболочки вокруг паразита, а сохраняется лишь в виде небольших фрагментов, которые обнаруживают признаки дегенерации. В тех участках столона, где трофамнион уже разрушился, клетки энтодермы сами начинают захватывать желток. Такие наблюдения были сделаны как на волжских полиподиях из стерляди и осетра (Райкова, 1960), так и на американском полиподии из веслоноса *Polyodon spathula* (Райкова и др., 1979). Таким образом, энтодермальные клетки столона приходят в соприкосновение с желтком лишь весной, т. е. только в конце паразитирования столона в икре, после нарушения целостности защитной и питающей оболочки паразита — трофамниона. Они не находятся в таком контакте в течение всего периода паразитической фазы развития, как это предполагалось ранее на основании факта извращенного положения зародышевых пластов (Липин, 1911).

При светомикроскопическом и ультраструктурном исследовании трофамниона в нем не удалось наблюдать мембран, которые могли бы рассматриваться как границы между клетками. Исследование цикла развития *Polypodium* показывает, что трофамнион развивается из одной клетки (Райкова, 1964, 1974, 1980а, 1980б) — направительного тельца, ядро которого сильно

полиплоидизируется, а цитоплазма гипертрофируется. Наши прежние представления о формировании трофамниона («капсулы») за счет слияния клеток, эмигрировавших из энтодермы личинки (Райкова, 1960), вероятно, нуждаются в пересмотре. По-видимому, наблюдавшиеся нами картины эмиграции клеток не имеют отношения к формированию трофамниона, а имеют какое-то иное значение, поскольку убедительных картин слияния эмигрировавших клеток так и не было найдено. На основании электронно-микроскопических наблюдений мы склонны рассматривать трофамнион не как синцитий, а как дериват всего лишь одной, сильно гипертрофированной и в норме абортивной клетки — направительного тельца мейоза.

Л и т е р а т у р а

- Васильев А. Е., Гамалей Ю. В. Белковые кристаллы в клетках растений. — Цитология, 1975, т. 17, № 4, с. 371—389.
- Догель В. А. Новые местонахождения и новые хозяева *Polypodium hydriforme*. — Зоол. журн., 1940, т. 19, № 2, с. 321—323.
- Догель В. А. Анализ паразитофауны осетровых и оценка ее патогенного значения. — Изв. АН КазССР, Сер. зоол., 1945, № 4, с. 9—19.
- Догель В. А. Задачи паразитологических исследований в связи с реконструкцией рыбного хозяйства. — Вопр. ихтиол., 1954, вып. 2, с. 57—68.
- Липин А. Н. Краткий очерк морфологического и гистологического строения пресноводной формы целентерат *Polypodium hydriforme*. Прилож. к протоколам засед. Общ. естествоисп. при Казанск. ун-те, 1908, № 245.
- (Липин А. Н.) Lipin A. Die Morphologie und Biologie von *Polypodium hydriforme* Uss. — Zool. Jahrb., Abt. Anat., 1911. Bd. 31, S. 317—426.
- (Липин А. Н.) Lipin A. N. Geschlechtliche Form, Phylogenie und systematische Stellung von *Polypodium hydriforme* Uss. — Zool. Jahrb., Abt. Anat., 1925, Bd 47, S. 541—635.
- Райкова Е. В. Гистохимическое исследование паразитической личинки *Polypodium hydriforme* Ussov (Coelenterata). — ДАН СССР, 1958, т. 121, № 3, с. 549—552.
- Райкова Е. В. Морфологическое и цитохимическое исследование паразитических стадий развития *Polypodium hydriforme* Ussov (Coelenterata). — Цитология, 1960, т. 2, № 2, с. 235—251.
- Райкова Е. В. Одноклеточные паразитические стадии цикла развития *Polypodium hydriforme* Ussov (Coelenterata). — Зоол. журн., 1964, т. 43, № 3, с. 409—412.
- Райкова Е. В. Цитофотометрическое изучение содержания ДНК в ядрах клеток *Polypodium hydriforme* Ussov (Coelenterata) на разных стадиях его жизненного цикла. — Журн. общ. биол., 1965, т. 26, № 6, с. 546—552.
- (Райкова Е. В.) Raikova E. V. Life cycle and systematic position of *Polypodium hydriforme* Ussov (Coelenterata), a cnidarian parasite of the eggs of Acipenseridae. — Publ. Seto Marine Biol. Lab., 1973, vol. 20 (Proc. 2nd Internat. Symp. on Chidaria), p. 165—173.
- (Райкова Е. В., Саппес В. Ч., Хоффман Г. Л.) Raikova E. V. Suppes V. Ch., Hoffman G. L. The parasitic coelenterate, *Polypodium hydriforme* Ussov, from the eggs of the American acipenseriform *Polyodon spathula*. — J. Parasitol., 1979, vol. 65, p. 804—810.
- Райкова Е. В. Приспособление *Polypodium hydriforme* Ussov к питанию на личиночной стадии развития. — В сб.: Теоретическое и практическое значение кишечнополостных, Л., ЗИН АН СССР, 1980а, с. 92—95.
- (Райкова Е. В.) Raikova E. V. Morphology, ultrastructure and development of the parasitic larva and its surrounding trophamion of *Polypodium hydriforme* Ussov (Coelenterata). — Cell Tissue Res., 1980, vol. 206, p. 487—500.

ULTRASTRUCTURE OF THE TROPHAMNION OF POLYPODIUM HYDRIFORME USSOV (COELENTERATA) AT THE FINAL STAGES OF ITS FUNCTIONING

E. V. Raikova

S U M M A R Y

A study of the trophic envelope (trophamion) ultrastructure around the stolon of *Polypodium* in autumn and summer oocytes of the sterlet and sturgeon has shown that the trophamion is a large hollow cell lining the parasitophore vacuole. The maximum trophic activity is displayed by the trophamion in oocytes with intensive vitellogenesis, i. e. in August—September. In May the trophamion degenerates. The ultrastructure of the trophamion functioning to full extent (the abundance of trophic inclusions, anastomosing microvilli in a shape of sieve, etc.) and that of the degenerating one (pynotisation of the nucleus, membrane degeneration of the cytoplasm) is described.