

УДК 576.895.121

## ДЕЙСТВИЕ ФЕНАСАЛА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ПОКРОВОВ ЦЕСТОДЫ *CARYOPHYLLAEUS LATICEPS*

А. В. Володин, Б. И. Куперман

В результате изучения действия антгельминтика фенасала на ультраструктуру тегумента цестоды *Caryophyllaeus laticeps* — паразита карповых — в опытах *in vitro* отмечены глубокие изменения в покровах сколекса, сопровождающиеся усилением секреции, образованием выпячиваний цитоплазмы, утратой микротрихий, дегенерацией наружного синцитиального слоя. В среднем отделе наблюдали уменьшение количества микротрихий и набухание слоя тегументальных клеток.

В последнее время в литературе появляются сообщения об устойчивых к антгельминтикам паразитах, что вызывает необходимость разработки и производства новых, более эффективных препаратов (Kelly, 1979). Чтобы ускорить и удешевить отбор потенциальных антгельминтиков, нужно внедрять новые экспресс-методы их первичной проверки. Разработка таких методов должна базироваться на знании механизма действия противопаразитарных средств. С этой точки зрения большую пользу принесет изучение морфологических и биохимических изменений в тканях гельминтов и их хозяев при действии антгельминтных препаратов.

В работе приводятся результаты изучения изменений ультраструктуры покровов цестод *Caryophyllaeus laticeps* — паразита карповых при действии фенасала в опытах *in vitro*.

### МЕТОДИКА

Половозрелых *C. laticeps*, собранных из кишечника лещей Рыбинского водохранилища, помещали в раствор Рингера, содержащий 10 мкг/мл фенасала на 0.5, 1, 2 и 4 ч. Контрольные экземпляры выдерживали в течение 4 ч в растворе Рингера без фенасала. По окончании инкубации гельминтов фиксировали 2.5 %-ным раствором глутарового альдегида в 0.1 М фосфатном буфере, рН 7.2; дофиксировали 1 %-ным раствором OsO<sub>4</sub> на 0.1 М фосфатном буфере, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в аралдит. Срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100 С. Анализировали состояние покровов сколекса и средней части тела червя.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Покровы (тегумент) *C. laticeps* состоят из поверхностного цитоплазматического, мышечного и клеточного слоев. Безъядерный цитоплазматический слой (синцитий) ограничен наружной и базальной мембранами, образует на поверх-

ности многочисленные микротрихии и содержит палочковидные тела и митохондрии с электронноплотным матриксом (рис. 1, 1, и 2, 1; см. вкл.).

Сколекс отличается от средней части тела червя фестончатой поверхностью, более длинными микротрихиями и наличием секреторных гранул. Клетки тегумента образуют цитоплазматические выросты, которыми они соединяются с наружным синцитиальным слоем. Клетки обладают всем набором органоидов, характерным для животной клетки, кроме того, в них содержатся палочковидные тела, а в сколексе еще и гранулы секрета.

Через несколько минут после помещения *C. laticeps* в раствор фенасала черви теряли подвижность, укорачивались и утолщались. После действия антгельминтика в течение 30 мин в сколексе можно наблюдать окруженные мембраной выпячивания наружной цитоплазмы, достигающие 9 мкм в высоту и 10 мкм в ширину (рис. 1, 2). Внутри этих образований находятся палочковидные тела, гранулы секрета и вакуоли. В ядрах и цитоплазме клеток тегумента появляются слоистые мембранные образования, похожие на миелиновые фигуры, но отличающиеся от последних неправильной формой (рис. 1, 7). В контроле (рис. 1, 6) такие структуры никогда не встречаются. Другие структуры остаются без изменений.

При часовом воздействии выпячивания наружной цитоплазмы увеличиваются в размерах и содержат большое количество гранул секрета (рис. 1, 3). В этот период происходит его массовый транспорт из клеток тегумента в наружный синцитий, затем в выросты цитоплазмы и, по-видимому, во внешнюю среду. В цитоплазматическом слое появляются также слоистые мембранные образования. С некоторых участков тегумента исчезают микротрихии.

После 2-часовой экспозиции выпячивания наружной цитоплазмы еще больше увеличиваются в объеме. К концу этого срока секреторных гранул в них становится меньше, чем при часовом воздействии. Слой наружной цитоплазмы становится заметно тоньше, а его митохондрии претерпевают серьезные изменения: они становятся мельче, чем в контроле, часто имеют неправильную форму, могут быть как конденсированными, так и набухшими, кристы расширяются (рис. 1, 4).

4-часовая экспозиция вызывает дальнейшее увеличение объема выпячиваний наружной цитоплазмы. По-видимому, эти образования могут сливаться друг с другом. Синцитиальный слой становится еще тоньше, в нем часто встречаются дегенерирующие митохондрии (рис. 1, 5). На поверхности тегумента уменьшается количество микротрихий. Клеточный слой набухает и вакуолизируется.

В средней части тела получасовое действие фенасала вызывает появление на поверхности тела *C. laticeps* отдельных грушевидных выпячиваний наружной цитоплазмы (рис. 2, 2). В отличие от сколекса эти образования по высоте не превышают микротрихий и наполнены гомогенным содержимым. В клеточном слое наблюдается некоторая дезорганизация, заключающаяся в его разрыхлении и набухании, что на микрофотографиях выглядит как появление электроннопрозрачных участков между отростками клеток. Нарушается ориентация цитоплазматических отростков тегументальных клеток, которые в контроле довольно строго направлены к базальной пластинке и на поперечных срезах тела представлены длинными тяжами цитоплазмы (рис. 2, 1). В опыте происходит искривление этих тяжей (рис. 2, 2). Электронная плотность матрикса митохондрий как в наружной цитоплазме, так и в клетках тегумента по сравнению с контролем несколько уменьшается. Другие структуры и органоиды остаются без изменений.

Через 1 ч количество выпячиваний наружной цитоплазмы увеличивается и на некоторых участках поверхности тегумента уменьшается количество микротрихий. Набухание и разрыхление клеточного слоя усиливается: объем межклеточного пространства, лишенного электронноплотного содержимого, увеличивается

ется, а отростки тегументальных клеток располагаются более хаотично, чем при получасовом воздействии. Митохондрии наружной цитоплазмы набухают, а в клетках эти органоиды становятся гетерогенными. Большая часть их также набухает, а меньшая вновь конденсируется (рис. 2, 5).

Через два часа количество микротрихий на теле червя заметно уменьшается. Изредка под поверхностной мембраной можно наблюдать микротрихии, погруженные в толщу цитоплазмы, причем обычно эти структуры лишены электронноплотной апикальной части. В клеточном слое продолжает усиливаться набухание и разрыхление — межклеточное пространство, лишенное электронноплотного содержимого, занимает по визуальной оценке более половины объема всего слоя. Отростки тегументальных клеток на срезах выглядят, как небольшие обособленные участки цитоплазмы.

После 4-часовой экспозиции количество микротрихий уменьшается еще больше, чем при 2-часовом воздействии, и значительная часть поверхности паразита становится гладкой. Оставшиеся микротрихии беспорядочно ориентированы и имеют различную высоту. Дезорганизация клеточного слоя достигает своего максимума (рис. 2, 3).

Таким образом, при действии фенасала в сколексе *Caryophyllaeus laticeps* происходит прогрессивное, зависящее от срока экспозиции, образование выростов и выпячиваний наружной цитоплазмы тегумента. Внутри этих образований содержатся гранулы секрета, палочковидные тела, митохондрии, вакуоли. Сам цитоплазматический слой утончается, теряет микротрихии, его митохондрии дегенерируют. В тегументальных клетках наблюдаются усиление секреторной и транспортной активности, появление слоистых структур и изменение строения митохондрий. В средней части тела червя уменьшается количество микротрихий, образуются небольшие выпячивания наружной цитоплазмы. Клеточный слой прогрессивно разрыхляется и набухает. Изменяются митохондрии наружного синцития и собственно тегументальных клеток.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ литературных данных показывает, что фенасал разрушает покровные ткани гельминтов. Так, у *Avitellina centripunctata*, отошедших после дегельминтизации овец, гистологическими методами было установлено практически полное отсутствие покровов (Кошкина и др., 1975). Известно, что в условиях *in vivo* происходит более значительное разрушение тегумента, чем *in vitro*, что связано, по-видимому, с действием протеолитических ферментов хозяина (Русак, 1964). В специальном исследовании этого явления было показано, что фенасал действительно делает возможным переваривание гельминта хозяином (Карташева, Прокофьева, 1982). Уменьшение количества микротрихий, утончение наружной цитоплазмы тегумента и обильное выделение секрета, наблюдавшееся в наших опытах, свидетельствуют о глубоких нарушениях структуры и функций тегумента. Подобные изменения позволяют заключить, что и в чистом виде фенасал влияет на жизнеспособность *C. laticeps* и, вероятно, приводит последнего к гибели. К сожалению, не представляется возможным более детально сравнить результаты, полученные нами, с данными других авторов, поскольку исследования, связанные с изучением изменений ультраструктуры покровов гельминтов под влиянием фенасала, ранее не проводились.

Фенасал действует не только на структуру тегумента, но и на его функционирование. Отмечено, что фенасал тормозит всасывание глюкозы (Карташева, Прокофьева, 1982). В то же время он вызывает нарушения в экскреторных процессах гельминтов, в частности, увеличивая выделение во внешнюю среду ряда ферментов (Куровская, 1981). Нарушением транспортных функций можно объяснить увеличение поперечных размеров и набухание *C. laticeps*, наблюдавшееся в наших опытах и отмеченное ранее для *Taenia saginatus* и *Himenolepis*

пана (Русак, 1964). По-видимому, нарушая процессы всасывания питательных веществ через покровы червя, фенасал делает их более проницаемыми для воды, вызывая прогрессивное набухание тела гельминта, что на микрофотографиях выглядит, как увеличение объема межклеточного пространства, лишенного электронноплотного содержимого. Подобная реакция характерна для гельминтов, содержащихся в среде с пониженной соленостью (Виноградов и др., 1982). Нами также было отмечено усиление экскреции при действии фенасала. Максимум выделения секрета приходится на конец первого часа инкубации, а затем процесс затухает.

Фенасал взаимодействует с белками, образуя сильные межмолекулярные связи (Кротов, Ягудаев, 1973). Это приводит к изменению активности ряда ферментов. Так, у *Fasciola hepatica* при действии антгельминтика ингибируется активность сукцинатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы (Бенедиктов, 1974). Известно, что у разных видов паразитов влияние фенасала может отражаться как в сторону повышения, так и в сторону понижения активности сукцинатдегидрогеназы (Рачковская, 1978). Поскольку сукцинатдегидрогеназа и малатдегидрогеназа имеют самое непосредственное отношение к процессам обеспечения организма энергией, становится ясно, почему в наших опытах изменялись митохондрии. На конформационные изменения митохондрий при нарушениях реакций энергетического обмена неоднократно указывалось (Bottrill, Hanson, 1969; Vuffa e. a., 1970). Гетерогенность митохондрий и их дегенерация свидетельствуют о скорой гибели организма. Появление слоистых структур указывает на глубокие изменения мембранных систем клетки (Володин, 1982). Нами также установлено, что степень повреждения *C. laticeps* зависит от срока действия фенасала.

Полученные нами данные о повреждении антгельминтиком митохондрий и мембранных комплексов позволяют предположить о побочном действии фенасала на органы рыб, поскольку такие структуры имеются в каждой клетке. Таким образом, возникает необходимость изучения действия противопаразитарных препаратов в комплексе как на гельминта, так и на хозяина.

#### Л и т е р а т у р а

- Бенедиктов И. И. Влияние антигельминтных препаратов на биохимические системы трематоды *Fasciola hepatica*. — Мед. паразитол., 1974, т. 43, № 6, с. 700—703.
- Виноградов Г. А., Давыдов В. Г., Куперман Б. И. Морфофизиологическое исследование механизмов адаптации к различным соленостям у псевдофилидных цестод. — Паразитология, 1982, т. 16, вып. 5, с. 377—383.
- Володин А. В. Цитопатология *Euglena gracilis* при действии некоторых ингибиторов метаболизма. — Автореф. канд. дис., М., 1982, 22 с.
- Карташева Л. Д., Прокофьева М. С. Влияние фенасала на катаболизм белков цестод и всасывание глюкозы. — Мед. паразитол., 1982, т. 60, № 6, с. 58—63.
- Кошкина И. Г., Логачев Е. Д., Тищенко Л. Г. К вопросу о цестодотропном действии фенасала. — В кн: Вопросы краевой инфекционной патологии Кузбасса. Томск, 1975, с. 136—139.
- Кротов А. И., Ягудаев М. М. Влияние белков на биологическую активность фенасала и его производных. — Мед. паразитол., 1973, т. 42, № 6, с. 726—727.
- Куровская Л. Я. Воздействие антгельминтика фенасала на фосфатазу цестоды *Botrioccephalus gowsonensis* в различных стадиях развития. — В кн: Эколого-морфологические особенности животных и среда их обитания. Киев, 1981, с. 129—132.
- Рачковская И. В. Влияние некоторых антгельминтных соединений на активность сукцинатдегидрогеназы в тканях паразитических нематод кишечника кур. — Изв. АН БССР. Сер. биол. н., 1978, № 4, с. 110—113.
- Русак Л. В. К изучению механизма действия фенасала (йомезана). — Матер. ВОГ, 1964, вып. 2, с. 118—122.
- Скачков Д. П., Казаченко Н. Г. Влияние дегельминтизации на гематологические изменения у сеголетков карпа при ботриоцефалезе. — Бюл. Всесоюз. ин-та гельминтол., 1981, № 30, с. 99—103.
- Bottrill D. E., Hanson J. B. The action of 2,4-dinitrophenol on corn root mitochondria. — Austral. J. Biol. Sci., 1969, vol. 22, N 4, p. 847—855.

- Buffa P., Guarriera-Bobyleva V., Muscatello U., Pasquali-Ronchetti I.  
Conformation changes of mitochondria associated with uncoupling of oxidative phosphorylation in vivo and in vitro. — *Nature*, 1970, vol. 226, N 5242, p. 272—274.
- Kelly J. D. Characteristics of anthelmintic resistant helminths. — In: 4-th Int. Congr. Parasitol., Warsaw, 1978. Short commun. Ser. D, 1978, p. 15.

ИБВВ АН СССР, Борок

Поступила 10.10 1986

---

EFFECT OF PHENASAL ON THE FINE STRUCTURE OF TEGUMENT OF THE  
CESTODE *CARYOPHYLLAEUS LATICEPS*

A. V. Volodin, B. I. Kuperman

S U M M A R Y

The effect of the antihelminthic preparation phenasal on the fine structure of tegument of the cestode *Caryophyllaeus laticeps*, a parasite of Cyprinidae, was studied in vitro. 10 mcg/ml concentration of phenasal causes numerous evaginations of the external cytoplasmic layer in the scolex of helminth. Inside these formations there are granules of secretion, mitochondria, vacuoles. At the same time microtrichia disappear from the surface, cytoplasmic layer gets thinner and its mitochondria degenerate. In the middle part of the body the number of microtrichia decreases, the layer of tegumental cells swells and conformational condition of its mitochondria changes. The degree of injury depends on the exposition time which was from 0 to 4 hours.

---

Вклейка к ст. А. В. Володина и др.

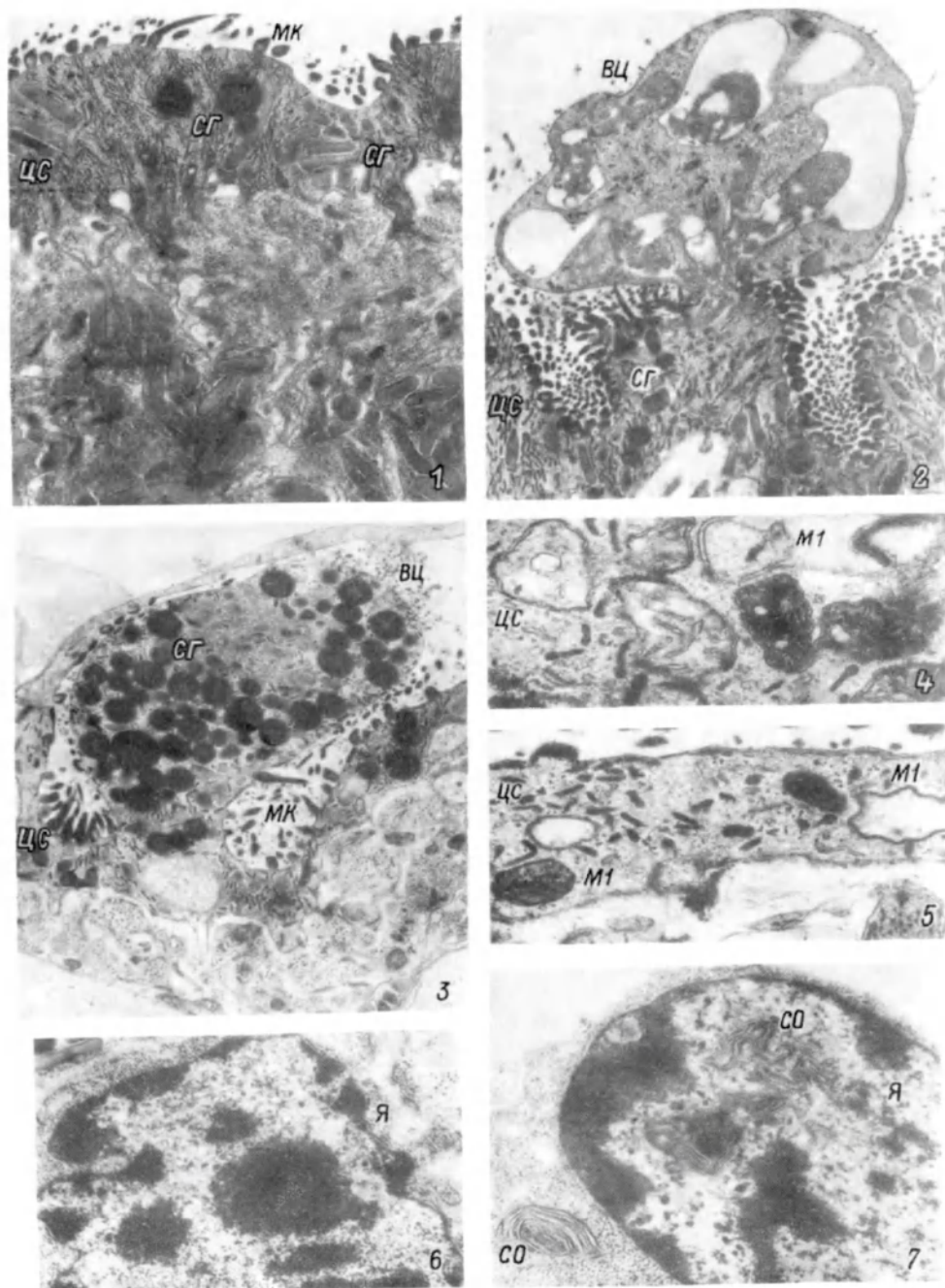


Рис. 1. Тегумент сколекса.

1 — контроль,  $\times 14\,500$ ; 2 — действие фенасала 30 мин,  $\times 12\,000$ ; 3 — действие фенасала 1 ч,  $\times 12\,000$ ; 4 — митохондрии, 2-часовая экспозиция,  $\times 45\,000$ ; 5 — митохондрии, 4-часовая экспозиция,  $\times 27\,000$ ; 6 — ядро, контроль,  $\times 21\,500$ ; 7 — ядро, действие фенасала 30 мин,  $\times 28\,000$ . ЦС — цитоплазматический слой, МК — микротрихии, СГ — секреторные гранулы, ВЦ — выпячивания цитоплазмы, М1 — митохондрии цитоплазматического слоя, Я — ядро, СО — слоистые образования.



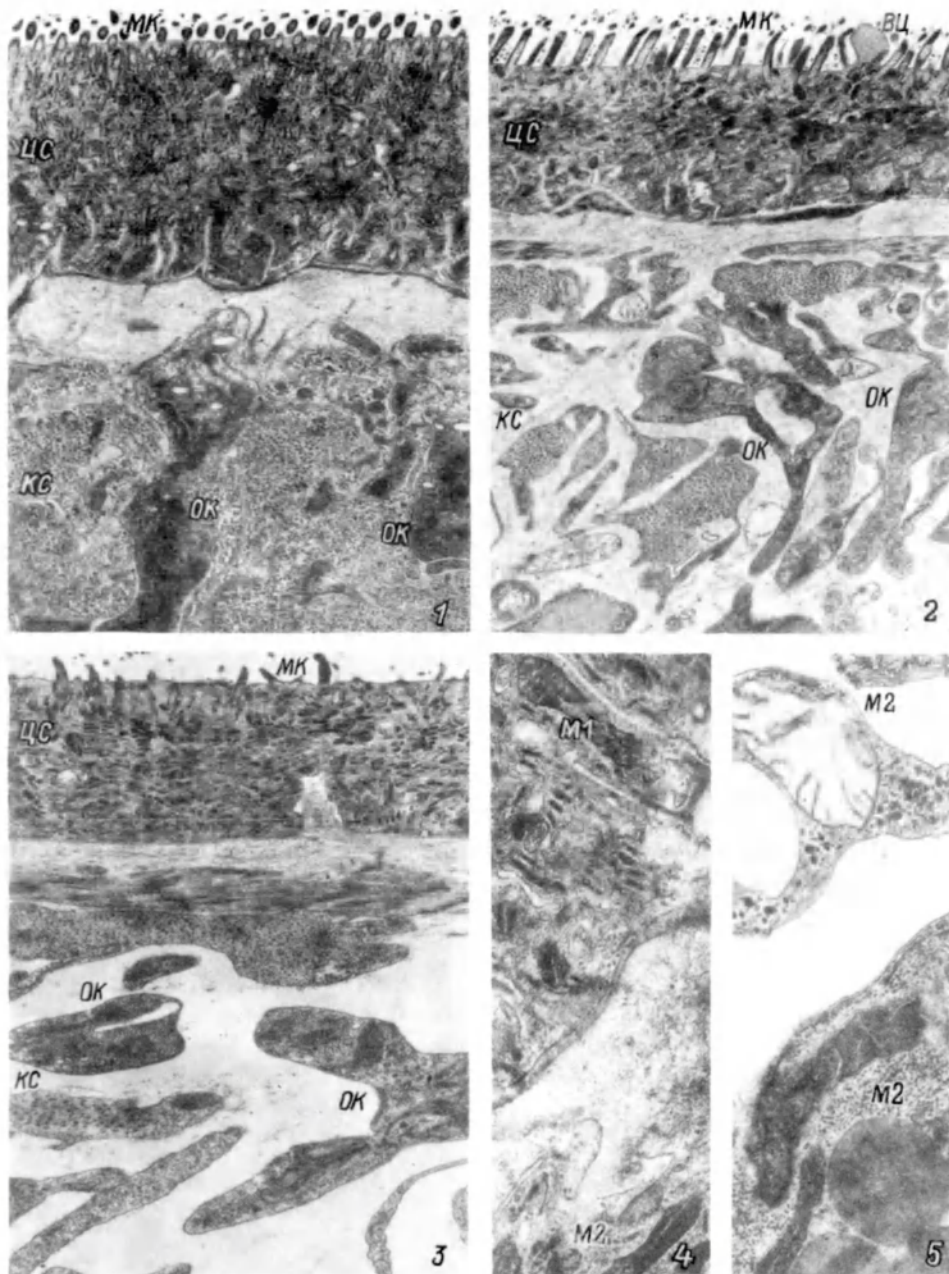


Рис. 2. Тегумент средней части тела.

1 — контроль,  $\times 13\ 000$ ; 2 — действие фенасала 30 мин,  $\times 13\ 000$ ; 3 — действие фенасала 4 ч,  $\times 16\ 000$ ; 4 — митохондрии, контроль,  $\times 16\ 000$ ; 5 — митохондрии, экспозиция с фенасалом 1 ч,  $\times 30\ 000$ . КС — клеточный слой, ОК — отростки тегументальных клеток, М2 — митохондрии клеточного слоя. Остальные обозначения, как и на рис. 1.