

УДК 597.122

**ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ МИКРОФАЛЛИДНЫХ ЦЕРКАРИЙ
(TREMATODA, MICROPHALLIDAE)****И. И. Малкова, К. В. Галактионов**

Впервые приводится описание различных отделов выделительной системы церкарий микрофаллидных трематод, изученных с помощью электронного микроскопа. Полученные данные сравниваются с аналогичными сведениями, имеющимися в литературе. Особо обсуждается вопрос о природе мочевых пузырей в различных группах трематод в связи с разделением последних по этому признаку на суперотряды Anepitheliocystidea и Epitheliocystidea (La Rue, 1957).

Организация выделительной системы церкарий трематод — один из важнейших таксономических признаков и необходимый элемент для филогенетических построений разного уровня (Гинецинская, 1968; Галактионов, Добровольский, 1987). Однако если на светооптическом уровне особенности ее строения изучены уже во всех группах дигеней, то число объектов электронно-микроскопических исследований пока еще мало. Среди них отсутствуют виды сем. Microphallidae, которое объединяет наиболее специализированных представителей плагиорхиидных трематод. Последнее обстоятельство делает ультраструктурные исследования микрофаллид особенно интересными, так как их результаты позволяют прояснить пути эволюции высших трематод.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Моллюски *Hydrobia ulvae* и *Littorina saxatilis*, зараженные микрофаллидами, были собраны летом 1986 г. в Онежском и летом 1987 г. в Кандалакшском заливах Белого моря. Спорцист, содержащих зрелых церкарий *Maritrema subdolum* (подсем. Maritrematinae), *Levinseniella brachysoma*, *Microphallus claviformis*, *M. sp.* Podlipajev, 1979 (подсем. Microphallinae), вырезали вместе с окружающей тканью из висцерального мешка инвазированных моллюсков (первые три вида — из *H. ulvae*, последний — из *L. saxatilis*). Их фиксацию осуществляли 2.5%-ным раствором глутарового альдегида в течение 1—2 ч при комнатной температуре. Затем следовали промывка в двух порциях фосфатного буфера (рН 7.4), дофиксация 1—2 ч 1%-ным водным раствором тетраоксида осмия и снова промывка в буфере. Осмомолярность всех рабочих растворов доводили примерно до 760 мОсМ добавлением сахарозы. После обезвоживания в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне материал заливали в аралдит. Срезы изготавливали на ультратоме ЛКВ-III, помещали на сетки с формваровой подложкой и окрашивали последовательно цитратом свинца по Рейнольдсу и насыщенным спиртовым раствором уранилацетата. Просмотр срезов вели на электронных микроскопах JEM 100 В и JEM 1200 EX.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Схема строения выделительной системы изученных нами видов микрофаллидных церкарий сходна (рис. 1). Ниже мы приводим ее обобщенное описание, оговаривая в тексте видоспецифичные детали морфологии.

В цитоците небольшое почковидное ядро обращено вогнутой стороной к основанию пучка ресничек «мерцательного пламени» (рис. 2, 1; см. вкл.). Цитоплазма содержит мелкие митохондрии со светлым матриксом и свободные рибосомы. Здесь же локализуются базальные тела ресничек, которые спаяны в плотные пучки (по 7—29 ресничек) при помощи аморфного гликокаликса. Ресничный пучок проходит через нефридиальную камеру и заканчивается внутри капилляра экскреторной системы (рис. 2, 2). Фильтрационный аппарат, роль которого играют стенки нефридиальной камеры, состоит из наружного и внутреннего слоев палочек, соединенных так называемой «фильтрационной мембраной» (рис. 2, 3). Их наружный слой представляет собой цитоплазматические выросты капилляра, а внутренний — цитоцита (рис. 2, 4). Выростами цитоплазмы последнего являются и внутренние лептотрихи, образующие в нефридиальной камере слой между фильтрационной решеткой и пучком ресничек. В осевой части палочек и лептотрихий обнаруживаются 2—3 продольные микро-трубочки (рис. 2, 3).

Капилляр и каналы более высокого порядка выполнены ядерным симпластом (рис. 1А, 2, 5, 6), уплощенные края которого соединяются септированными десмосомами с образованием трубчатого просвета — полости канала. Основная масса цитоплазмы и крупные, неправильной формы ядра располагаются по периферии. Здесь же находятся многочисленные митохондрии и шероховатый ЭПР. Кроме того, в цитоплазме обнаруживаются свободные рибосомы и большое количество мелких электронноплотных гранул — предположительно, гликогена. В просвет канала направлены короткие и толстые цитоплазматические выросты (рис. 2, 5). Главные собирательные каналы связаны с выстилкой мочевого пузыря септированными десмосомами (рис. 2, 6а).

Полость мочевого пузыря ограничена тонкой синцитиальной пластинкой, внутренняя поверхность которой несет длинные гребневидные образования — ламеллы (рис. 1, А; 3, 1, 2; см. вкл.). Часть из них срастается, формируя сложные комплексы; некоторые заканчиваются расширениями с мелкими пузырьками или содержат их на всем своем протяжении. Внешняя цитоплазма ламелл сильно уплотнена, над плазматической мембраной наблюдается гликокаликс. Электронно-светлая цитоплазма синцитиальной пластинки изобилует митохондриями, мелкими пузырьками и электронно-плотными гранулами (по-видимому, гликогена). Изредка встречаются небольшие мультиламеллярные тела. Митохондрии очень крупные, со светлым матриксом и малочисленными трубчатыми кристами. Синцитиальный слой мочевого пузыря подстилает фиброзная базальная пластинка. Ее пробивают короткие толстые цитоплазматические отростки, связывающие выстилку пузыря с цитонами. Последние крупные, округлой формы, с большими ядрами. Именно они при наблюдении в световой микроскоп создают впечатление эпителизованного мочевого пузыря. В цитонах наблюдаются те же органеллы, что и в синцитиальном слое, а также немногочисленные цистерны шероховатого ЭПР. У зрелых церкарий рода *Microphallus* здесь обнаруживаются гранулы диаметром 1.3—1.6 мкм с электронноплотным содержимым. Они присутствуют также и в цитоплазматических отростках и в синцитиальной пластинке (рис. 3, 1). У личинок *L. brachysoma* и *M. subdolum* подобных включений нет (рис. 3, 2). Мочевой пузырь опоясан пучками гладких мышц. Они проходят под базальной пластинкой между цитоплазматическими отростками и цитонами.

Экскреторная пора имеет вид воронки, расширенная часть которой открывается в полость мочевого пузыря (рис. 1, Б, 3, 1). С синцитиальной пластинкой

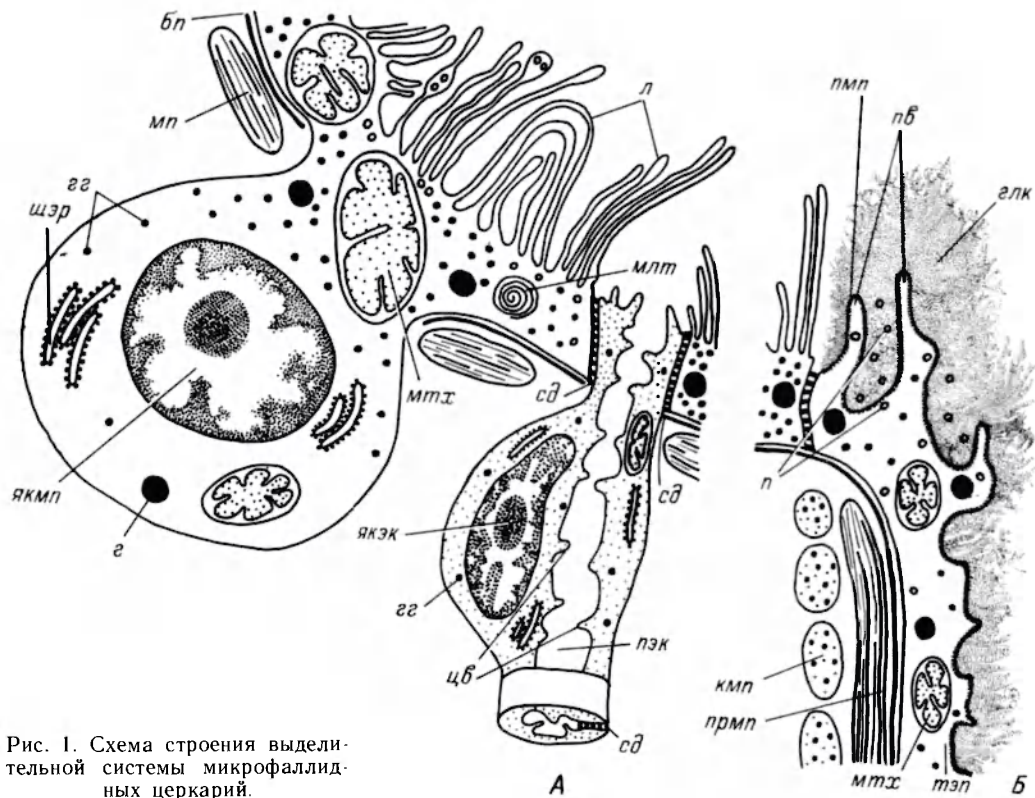


Рис. 1. Схема строения выделительной системы микрофаллидных церкарий.

А — мочевой пузырь в месте соединения с экскреторным каналом; Б — экскреторная пора в месте соединения с мочевым пузырем: бл — базальная пластинка; г — гранулы, гг — гранулы гликогена; глк — гликокаликс; кмп — кольцевые мышечные пучки сфинктера экскреторной поры; л — ламеллы; млт — мультиламеллярные тела; мп — мышечные пучки; мтх — митохондрии; п — пузырьки; пв — пальцевидные выросты тегумента экскреторной поры; пмп — полость мочевого пузыря; прмп — продольные мышечные пучки сфинктера экскреторной поры; пэк — просвет экскреторного канала; сд — септированная десмосома; тэл — тегумент экскреторной поры; цв — цитоплазматические выросты; шэр — шероховатый эндоплазматический ретикулум; якм — ядра клеток мочевого пузыря; яэк — ядра клеток экскреторного канала.

последнего выстилка поры связана длинной септированной десмосомой. Сама она выполнена непосредственным продолжением тегумента тела церкарии, у которого здесь уменьшается толщина, исчезают все (либо почти все) типы секреторных гранул и такие структуры, как микроворсинки у *L. brachysoma*, шипы у *M. sp.* и *M. claviformis* и языковидные выросты у *M. subdolum* (Малкова, 1987). Отличительной чертой тегумента поры является наличие длинных пальцевидных выростов, особенно крупных в ее расширенной проксимальной части, где они выступают в полость мочевого пузыря.

Вторая характерная особенность — формирование фиброзно-гранулярного гликокалика, который заполняет весь просвет поры. Среди его волокон у церкарий *M. claviformis* наблюдаются мелкие пузырьки (рис. 3, 1). Тонкий слой цитоплазмы выстилки поры, прилежащий к наружной плазматической мембране, имеет высокую электронную плотность. В цитоплазме обнаруживаются крупные митохондрии, а также большое число мелких электронноплотных гранул и пузырьков. Предположительно первые представляют собой гранулы гликогена, а вторые имеют пиноцитозную природу. В выстилке поры личинок родов *Microphallus* и *Levinseniella* присутствуют небольшие включения с электронноплотным содержанием. Морфологически они идентичны одному из типов секреторных гранул тегумента тела (Малкова, 1987) и секреторным включениям мочевого пузыря. Под базальной мембраной выстилки поры проходит базальная пластинка, которая составляет неразрывное целое с базальной пластинкой

тегумента тела и далее продолжается в аналогичную структуру мочевого пузыря. Пору окружают два слоя пучков гладкомышечных клеток: непосредственно к базальной пластинке примыкают продольные мышцы, а за ними следует более толстый слой кольцевых. Наиболее сильно мускулатура развита вблизи наружного отверстия. Здесь формируется сфинктер, работа которого обеспечивает открывание и захлопывание полости поры (рис. 2, 3).

В нашем материале имеется ряд электронограмм, которые получены со срезов церкарий, находящихся на завершающих этапах морфогенеза. Зачаток мочевого пузыря представлен у них ядерным синцитием, который окружает формирующуюся полость (рис. 3, 4). Синцитиальный слой толстый, его внутренняя поверхность уже несет ламеллы. Ядра крупные с нуклеолой и равномерно диспергированным хроматином. В цитоплазме обнаруживается тот же набор органелл, что и в выстилке мочевого пузыря зрелых церкарий, однако митохондрии гораздо мельче и представлены менее обильно. При дальнейшем развитии личинки происходит обособление участков перинуклеарной цитоплазмы и их погружение в окружающую зачаток мочевого пузыря паренхиму (рис. 3, 5). Таким образом, возникает та морфологическая организация, которую мы описали выше для зрелых церкарий.

ОБСУЖДЕНИЕ

Тонкая морфологическая организация выделительной системы церкарий микрофаллид не выпадает из общего плана, который вырисовался при обобщении накопленных в литературе сведений (Галактионов, Добровольский, 1987). Морфология протонефридиев, по-видимому, консервативна для всех Trematoda, Cestoda и Monogenea (Ehlers, 1986; Rohde, Watson, 1987; Xylander, 1987). Типичным для них указывается происхождение наружного слоя палочек фильтрационного аппарата от капилляра, а внутреннего — от циртоцита. В качестве специфичных черт протонефридиев церкарий микрофаллид можно отметить наличие внутренних лептотрихий и малое число ресничек в пучке. Последний признак у церкарий сильно варьирует от 60—100 — у *Schistosoma japonica* (Göbel, Pan, 1985) до 15 — у *Cryptocotyle lingua* (Rees, 1977). Небольшое количество ресничек в пучке клеток мерцательного пламени личинок микрофаллид скорее всего является следствием присущей этой группе эволюционной тенденции к ювенилизации и миниатюризации особой гермафродитного поколения (Галактионов, Добровольский, 1987). Что же касается лептотрихий, то они описаны в нефридиальных камерах ряда трематод и цестод (Orido, 1987; Rohde, Watson, 1987; Xylander, 1987, и др.).

Авторы большинства работ по ультраструктуре трематод (Gallagher, Threadgold, 1967; Powell, 1972; Тихомиров, 1980, и др.) указывают для каналов выделительной системы то же строение, что и выявлено нами для церкарий микрофаллид. Особняком стоят данные Рис (Rees, 1977), которая для церкарий *Cryptocotyle lingua* описала клеточное строение экскреторных каналов. На поперечном срезе через такой канал обнаруживаются 3—4 крупные клетки, плазматические мембраны которых соединяются постоянными клеточными контактами. Полость канала в этом случае образуется межклеточно.

Различия в строении мочевых пузырей церкарий послужили основанием для разделения всех трематод на два суперотряда: Anepitheliocystidea и Epitheliocystidea (La Rue, 1957). И хотя принцип, лежащий в основе этой классификации (неклеточная природа стенок мочевого пузыря у Anepitheliocystidea), не подтвердился электронно-микроскопическими исследованиями, отказываться от нее пока еще преждевременно. Она отражает реальные особенности морфологической организации мочевых пузырей у представителей разных семейств трематод, хотя и не те, что постулировал Ля Ру (La Rue, 1957) (Галактионов, Добровольский, 1987). По современным данным, у особой гермафродитного поколения

большинства трематод мочевого пузыря выполнен синцитиальной пластинкой (исключение представляют шистосоматиды, у которых вместо мочевого пузыря формируется экскреторный атриум — производное тегумента тела (Powell, 1973), которая у церкарий группы Anepitheliocystidea тонкая и содержит ядра, а у Epitheliocystidea — ядра с окружающей их цитоплазмой погружены в глубь паренхимы и сохраняют связь с синцитиальным слоем благодаря цитоплазматическим отросткам. Цитоны крупные, прилегают друг к другу и при наблюдении в световой микроскоп создается впечатление, что стенки мочевого пузыря выстланы кубическим эпителием, т. е. «эпителизованы» (Powell, 1972). Таков и общий план строения мочевого пузыря у изученных нами церкарий микрофаллид, которые по классификации Ля Ру (1957) относятся к группе Epitheliocystidea.

В результате светооптических исследований (Hussey, 1941; Kuntz, 1952; La Rue, 1957, и др.) сложилось представление о принципиальном различии в природе мочевого пузыря Anepitheliocystidea и Epitheliocystidea. У первых он формируется в результате слияния проксимальных отделов главных собирательных каналов. У вторых его стенки представляют собой продукт специализации особых «мезодермальных клеток», которые появляются у эмбрионов церкарий в районе сливающихся проксимальных отделов главных собирательных каналов. Поуэлл (Powell, 1972) на электронно-микроскопическом уровне описал у церкарии *Ochetosoma aniarum* формирование «эпителизованного» мочевого пузыря в результате погружения ядер выстилки проксимальных отделов главных собирательных каналов. Он предположил, что эти ядра и принимались ранними исследователями за «мезодермальные» клетки зачатка мочевого пузыря Epitheliocystidea. Наш материал по развитию мочевого пузыря церкарий микрофаллид также говорит в пользу этой точки зрения. В таком случае принципиальные различия в происхождении мочевого пузыря у двух суперотрядов трематод отсутствуют.

В то же время Рис (Rees, 1977) у церкарий *Cryptocotyla lingua* описала образование мочевого пузыря за счет слияния особых «мезодермальных» клеток с объединившимися проксимальными участками главных собирательных каналов. Можно допустить, что Рис ошиблась в трактовке электронограмм и неправильно интерпретировала процесс погружения ядер эпителия формирующегося мочевого пузыря. Все же нам представляется, что вопрос о природе мочевого пузыря у Epitheliocystidea на сегодняшний день нельзя считать окончательно решенным. Все упомянутые авторы, включая авторов настоящей статьи, демонстрируют на электронограммах лишь завершающие этапы морфогенеза этого органа. Такие принципиальные вопросы как последовательность тканевой дифференциации каналов выделительной системы, и особенно проксимальных отделов главных собирательных каналов, момент отделения формирующегося мочевого пузыря от главных собирательных каналов септированной десмосомой и др. остаются неисследованными.

Характерная особенность мочевого пузыря микрофаллидных церкарий — высокая степень гипертрофии внутренней поверхности. Сходная картина обнаружена пока только у церкарий *Podocotyle staffordi* (Gibson, 1973). У остальных исследованных в этом отношении личинок трематод в полость пузыря вдаются отдельные тонкие короткие выросты (Кгура е. а., 1969; Powell, 1972; Rees, 1977; Popiel, 1977, и др.). Авторы практически всех имеющихся в литературе описаний тонкой морфологии мочевого пузыря церкарий указывают на наличие в его выстилке секреторных гранул (Кгура е. а., 1969; Powell, 1972; Rees, 1977, и др.). Их функциональное назначение до конца не выяснено. Предполагается, что содержимое гранул выводится в полость пузыря и может служить для иммобилизации продуктов обмена на стадии метацеркарии (Кгура е. а., 1969). При исследовании морфогенеза метацеркарий *Maritrema linguilla* выяснилось, что в ткани мочевого пузыря формируется секрет, идущий на образование четвер-

того слоя цисты (Benjamin, James, 1987). Представляется вероятным, что содержимое секреторных гранул, обнаруженных у исследованных нами микрофаллидных церкарий, выполняет сходную функцию. Малое их количество и даже полное отсутствие у личинок *M. subdolum* и *L. brachysoma* может указывать на то, что максимум секреторной активности выстилки мочевого пузыря приходится на начальные этапы развития метацеркарии, непосредственно предшествующие образованию соответствующего слоя цисты. Участие продуктов, секреторируемых мочевым пузырем в процессе цистообразования отмечено также и для личинок *Stictodora lari* (Leong, Howell, 1971).

Литература

- Галактионов К. В., Добровольский А. А. Гермафродитное поколение трематод. Л., 1987. 192 с.
- Гинецинская Т. А. Трематоды: их жизненные циклы, биология и эволюция. Л.: Наука, 1968. 411 с.
- Малкова И. И. Электронно-микроскопическое исследование покровов церкарий семейства Microphallidae // Тез. докл. 4-го Всесоюз. симпозиума по паразитол. и патол. морск. организмов. Калининград, 1987. С. 32—34.
- Тихомиров И. А. Жизненный цикл *Philophthalmus rhionica* sp. nov. (Trematoda: Philophthalmidae): Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л., 1980. 20 с.
- Benjamin L. R., James B. L. The development of the metacercaria of *Maritrema linguilla* Jag., 1908 (Digenea: Microphallidae) in the intermediate host, *Ligia oceanica* (L.) // Parasitology, 1987. Vol. 94, N 2. P. 221—231.
- Ehlers U. Comments on a phylogenetic system of the Platyhelminthes // Hydrobiologia. 1986. Vol. 132, N 1. P. 1—12.
- Gallagher S. S. E., Threadgold L. T. Electron microscope studies of *Fasciola hepatica*. II. The interrelationship of the parenchyma with other organ systems // Parasitology. 1967. Vol. 57, N 4. P. 633—637.
- Gibson D. J. Some ultrastructural studies on the excretory bladder of *Podocotyle staffordi* Miller, 1941 (Digenea) // Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.) Zool. 1973. Vol. 24, N 9. P. 461—465.
- Göbel E. P., Pan J. P. Ultrastructure of the daughter sporocyst and developing cercaria of *Schistosoma japonicum* in experimentally infected snails, *Oncomelania hupensis hupensis* // Z. Parasitenk. 1985. Vol. 71, N 2. P. 227—240.
- Hussey K. L. Comparative embryological development of the excretory system in digenetic trematodes // Trans. Amer. Microscop. Soc. 1941. Vol. 60. P. 171—210.
- Крупя П. Л., Cousineau G. H., Bal A. K. Electron microscopy of the excretory vesicle of a trematode cercaria // J. Parasit. 1969. Vol. 55. P. 985—992.
- Kuntz R. E. Embryonic development of the excretory system in a Pleurolophocercous cercariae, three stylet cercariae, and Microcaudate Eucotylid cercaria // Trans. Amer. Microscop. Soc. 1952. Vol. 71. P. 45—82.
- La Rue G. R. The classification of Digenetic Trematoda: a review and a new system // Exp. Parasitol. 1957. Vol. 6. P. 306—349.
- Leong C. H. D., Howell M. J. Formation and structure of the cyst wall of *Stictodora lari* (Trematoda: Heterophyidae) // Z. Parasitenk. 1971. Bd 35. S. 340—350.
- Orido Y. Metamorphosis of the excretory system of *Paragonimus ohirai* (Trematoda), with special reference to its functional significance // J. Morphol. 1987. Vol. 194, N 3. P. 303—310.
- Popiell I. The ultrastructure of the excretory bladder of the free living cercaria and metacercaria of *Cercaria stunkardi* Palombi, 1934 (Digenea: Opecoelidae) // Z. Parasitenk. 1977. Vol. 51, N 3. P. 249—260.
- Powell E. C. Optical and electron microscope studies on the excretory bladder of the supposed epitheliocystid cercaria of *Ochetosoma aniarum* // Z. Parasitenk. 1972. Bd 40, Hf. 1. S. 19—30.
- Powell E. C. Studies on the excretory «bladder» and caudal ducts of the supposed anepitheliocystid cercaria of *Schistosoma mansoni* // Z. Parasitenk. 1973. Bd 43, Hf. 1. S. 43—52.
- Rees F. G. The development of the tail and the excretory system in the cercaria of *Cryptocotyle lingua* (Creplin) (Digenea: Heterophyidae) from *Littorina littorea* (L.) // Proc. Roy. Soc. London. 1977. Vol. B 195, N 1121. P. 425—452.
- Rohde K., Watson N. Ultrastructure of the protonephridial system of larval *Austramphilinea elongata* (Platyhelminthes, Amphilinea) // J. Submicroscop. Cytol. 1987. Vol. 19, N 1. P. 113—118.
- Xylander W. E. R. Ultrastructure of the lycophora larva of *Gyrocotyle urna* (Cestoda, Gyrocotylidae). III. The protonephridial system // Zoomorphology. 1987. Vol. 107. P. 88—95.

Мурманский морской биологический институт,
КНИЦ АН СССР, Дальние Зеленцы

Поступила 4.04.1988

ELECTRON-MICROSCOPE INVESTIGATION OF THE EXCRETORY SYSTEM OF MICROPHAL-
LID CERCARIAE (TREMATODA, MICROPHALLIDAE)

I. I. Malkova, K. V. Galaktionov

S U M M A R Y

The description of different parts of the excretory system of microphallid cercariae studied by means of electron microscopy is given for the first time. It is shown that although fine structure of cyrtocytes, excretory canals, bladder and pore of investigated larvae corresponds to the general plan of trematodes well known from the literature, it has a number of specific features. Obtained data are compared with analogous literature information devoted to trematodes. The question on the nature of excretory bladders in different trematode groups is now posed in connection with the division of the latter according to this sign into the superorders Anepitheliocystidea and Epitheliocystidea.

Вклейка к статье И. И. Малковой и др.

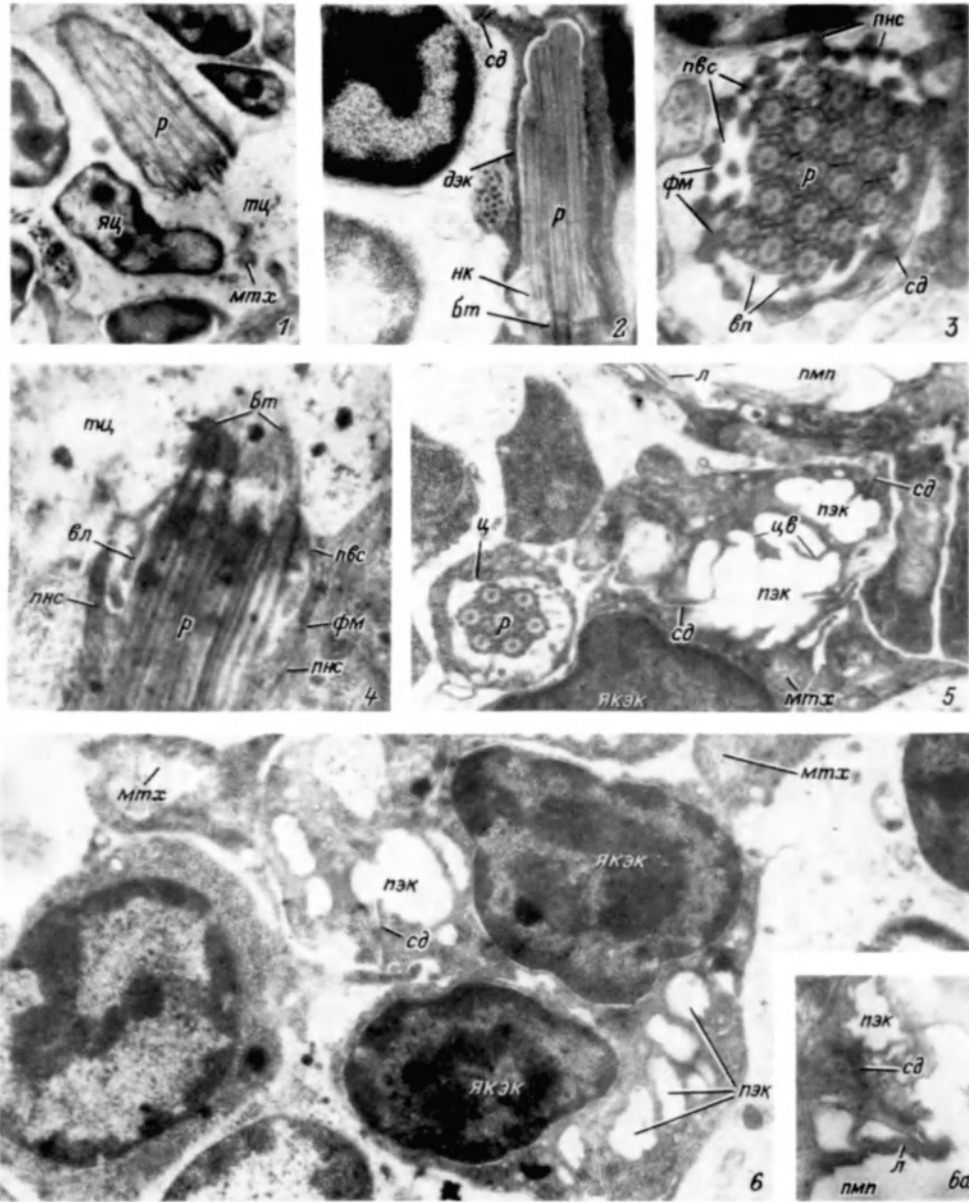


Рис. 2. Строение циртоцитов, экскреторного канала и мочевого пузыря микрофаллидных церкарий.

1 — циртоцит церкарии *Maritrema subdolum* ($\times 15\,000$), ТЭМ *р* — реснички мерцательного пламени, *тц* — тело циртоцита, *яц* — ядро циртоцита; 2 — продольный срез циртоцита церкарии *Microphallus claviformis* ($\times 19\,500$), ТЭМ. *бт* — базальное тельце, *дэк* — дистальный отдел экскреторного капилляра, *нк* — нефридиальная камера, *р* — реснички мерцательного пламени; 3 — поперечный срез циртоцита церкарии *Maritrema subdolum* ($\times 32\,000$), ТЭМ, *вл* — внутренние лептотрихи, *пвс* — палочки внутреннего слоя, *пнс* — палочки наружного слоя, *фм* — фильтрационная мембрана; 4 — продольный срез циртоцита *M. subdolum* ($\times 28\,900$), ТЭМ; 5 — различные отделы выделительной системы церкарии *M. claviformis* ($\times 18\,000$), ТЭМ; 6 — экскреторный канал церкарии *M. subdolum* ($\times 25\,000$), ТЭМ; *ба* — контакт мочевого пузыря и экскреторного канала церкарии *M. subdolum* ($\times 48\,000$), ТЭМ.

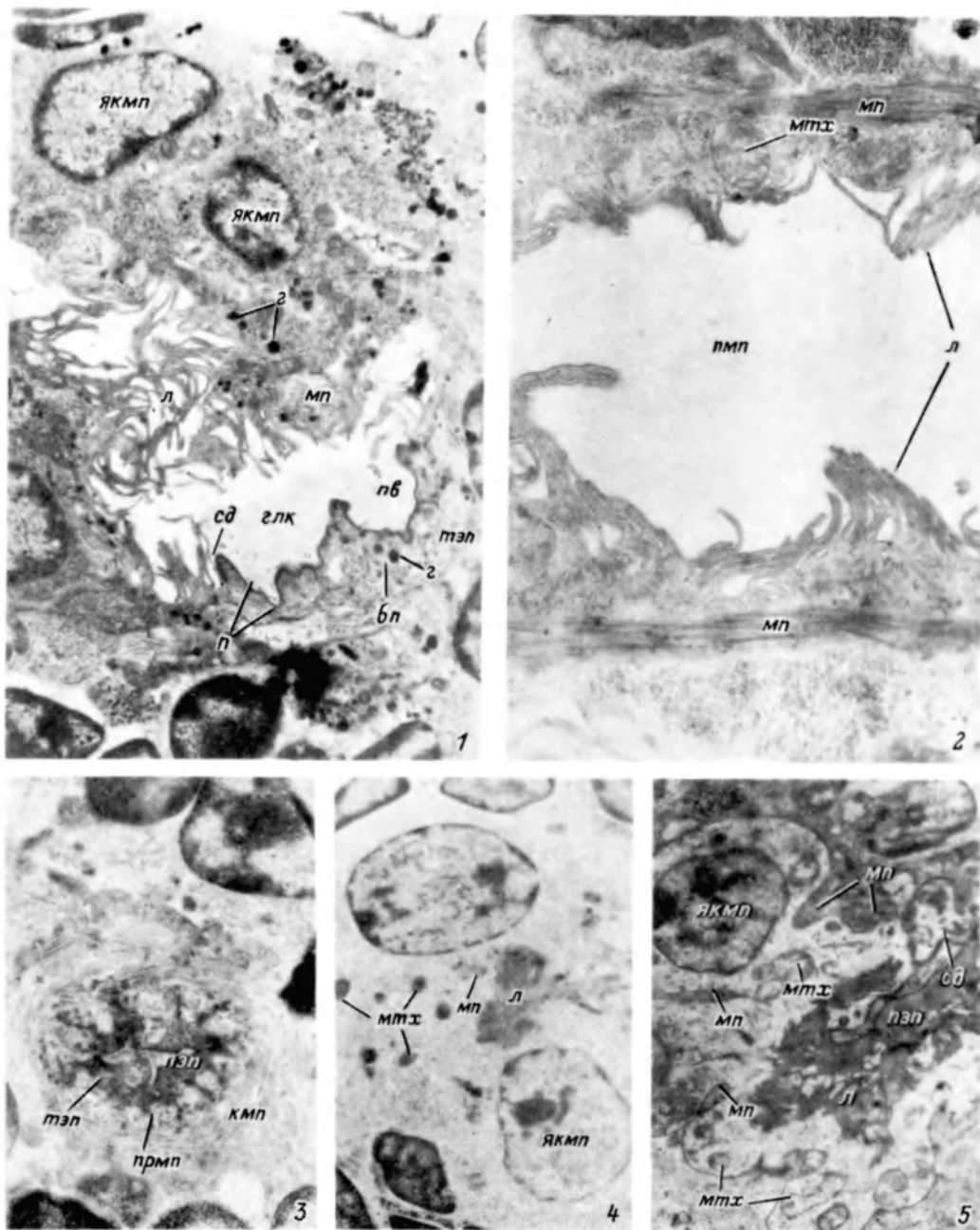


Рис. 3. Строение мочевого пузыря и экскреторной поры микрофаллидных церкарий

1 — мочевого пузыря и экскреторная пора церкарии *Microphallus claviformis* ($\times 18\,560$), ТЭМ; 2 — мочевого пузыря церкарии *Maritrema subdolum* ($\times 32\,000$), ТЭМ; 3 — поперечный срез сфинктера экскреторной поры церкарии *Microphallus claviformis* ($\times 21\,600$), ТЭМ; 4 — мочевого пузыря молодой церкарии *M. sp.* ($\times 8100$), ТЭМ; 5 — мочевого пузыря молодой церкарии *Maritrema subdolum* ($\times 9600$), ТЭМ. Обозначения такие же, как на рис. 1.