

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ОБОЛОЧЕК ОНКОСФЕРЫ *TAENIA PISIFORMIS*
(BLOCH., 1780) GMELIN, 1790 И *T. HYDATIGENA*
PALLAS; 1766 (CYCLOPHYLLIDEA, CESTOIDEA)

Л. Н. РОМАНЕНКО, С. О. МОВСЕСЯН

Всесоюзный институт гельминтологии им. К. И. Скрыбина, Москва,
Институт зоологии АН АрмССР, Ереван

Аннотация. Описана ультраструктура преонкосферы на примере изучения цестод *Taenia pisiformis* и *T. hydatigena*. Установлено, что преонкосфера окружена 7 оболочками. Зрелая онкосфера образует многочисленные выросты, контактируя с эпителиальными клетками стенки матки. Зародыш окружен четырьмя тонкими оболочками. Внутренняя часть зародыша заполнена в ранней преонкосфере однослойным эпителием, из которого иммигрирует двуядерная клетка в центральную часть, сохраняя нитевидные связи с остальными клетками зародыша.

Սեռնագրիս — նկարագրում է նախառնկոսֆերայի ուրդառնկոսֆերան *Taenia pisiformis* և *T. hydatigena* շեփուղների ուսումնասիրության օրինակի վրա նախառնկոսֆերան շրջապատում է 7 թաղանթներով: Հասուն օնկոսֆերան առաջացնում է բազմաթիվ էջուտներ, որոնց միջոցով յուրաքանչյուրում է արգանդի պատի էպիթելիային բջիջների հետ: Սաղմը շրջապատված է 4 բարակ Վաղանթներով: Սաղմի ներքին մասը զբաղ շեփուղներում լցված է միաշերտ էպիթելով, որից դուրս կենտրոնական մասն է ներգաղթում երկհարկանի բջիջ՝ պահպանելով թելանման կապերը սաղմի մյուս բջիջների հետ:

Abstract. The ultrastructure of pre-oncosphere is described on the example of the study of cestodes *Taenia pisiformis* and *T. hydatigena*. The pre-oncosphere is enclosed in 7 membranes. The mature oncosphere forms numerous outgrowths, coming into contact with the epithelial cells of the womb walls. The embryo is enclosed in four thin membranes. The internal part of the embryo is full in an early pre-oncosphere one-layer epithelium, from which a two-nuclei cell emigrates to the central part, maintaining thread-like links with the remaining cells of the embryo.

Ключевые слова: морфогенез преонкосферы и онкосферы цестод, циклофилидные цестоды, эмбриональное развитие.

Формирование и тонкое строение эмбриональных оболочек онкосферы описаны у небольшого числа видов циклофилидных цестод [9, 17, 21—22, 25, 27—30, 33]. Установлено, что в разных группах цестод онкосфера формируется различным способом, оболочки их состоят из разного клеточного материала. До сих пор остается малоизученным и во многих отношениях неясным морфогенез онкосфер различных представителей цестод, расшифровка которого явится важным аргументом при

выяснении их онтогенеза и установлении филогенетического родства между родами и более крупными таксонами.

В настоящей работе дается описание ультраструктуры оболочек оокисты *T. pisiformis* и *T. hydatigena*, эмбриональное развитие которых ранее не изучалось.

Материал и методика. Работа была проведена в Институте зоологии АН АрыССР и ВИГИС в 1979—1981 гг. Зрелые цестоды собраны от экспериментально и спонтанно зараженных собак. Целых живых цестод предварительно инкубировали в теплом физиологическом растворе в течение 1—2 ч для удаления с поверхности их тела кишечного содержимого. После этого лезвием бритвы отделяли отдельные проглоттиды с разных участков стробилы. Проглоттиды в свою очередь разрезали на мелкие кусочки размером 1 мм³. Эту процедуру проводили в охлажденном 2,5%-ном глутаровом альдегиде на фосфатном буфере с pH 7,2—7,4. Кусочки сразу переносили в свежий фиксатор на 3—6 ч, затем материал промывали в охлажденном буфере с добавленной сахарозой, фиксировали в 1%-ном тетраоксиде осмия с добавленным танином и сахарозой (40 мг/мл), выдерживали 1—2 ч на холоде и обезвоживали в спиртах возрастающей крепости. Материал контрастировали в спиртовом уранилцетате 12 ч, обезвоживали в спиртах возрастающей крепости и ацетоне, заключали затем в эпоксидные смолы. Ультратонкие срезы получены на ультратоме ЛКВ, окрашены цитратом свинца по Рейнольду, контрастированы 2%-ным водным уранил-ацетатом. Электронограммы получены при напряжении 90 кВ.

Результаты и обсуждение. Наружная капсула: представлена очень тонкой, электроннопрозрачной оболочкой, покрывающей ооцит и желточные клетки, вероятно, еще в ооците. В матке наружная капсула более плотная, толщиной 2 нм, и свободно прилегает к поверхности ооцита, а позднее — в наружной оболочке зародыша (рис., 4).

Наружная оболочка: к концу 10-го деления дробления происходит миграция макромеров 4А, 4В и С на поверхность зародыша, которые вместе с желточными клетками создают наружную оболочку. Ядра макробластомеров крупные (10 нм) с зернистой электронноплотной кариоплазмой без морфологических признаков хроматина и ядрышек. Ядерная оболочка состоит из двух мембран, отделяющих ядро от большого слоя цитоплазмы. После слияния цитоплазмы макромеров наружная оболочка сильно разбухает, отчего зародыш сильно увеличивается в длину. Снаружи оболочка ограничена тонкой цитоплазматической мембраной (рис., 1—4). В двойной ядерной мембране заметно различаются многочисленные поры. Цитоплазма наружной оболочки включает многочисленные митохондрии—овальные, продолговатые и треугольные—с различным расположением крист, мешковидные лизосомы однородной электронной плотности или с палочковидными включениями, аппарат Гольджи и ряд других недифференцированных органоидов. Оболочка также состоит из большого количества овальных желточных глобул, внутренняя структура которых представлена регулярно чередующимися электронноплотными и светлыми полосами. Выявляются крупные липидные вакуоли однородной электронной плотности, заметно отличающиеся от желточных глобул, и очень крупные электроннопрозрачные вакуоли.

По мере созревания оокисты наружная оболочка сильно уменьшается и по наружному краю зрелой оокисты образует многочислен-

ные цитоплазматические выросты, контактирующие с аналогичными выростами клетки стенки матки (рис., 10—13). В ней сохраняются многочисленные, разнообразные по форме и функции органоллы.

Внутренняя оболочка формируется одновременно с наружной макромерами 1a, 1b и 2b, которые до конца дробления сохраняют тесную связь друг с другом. Их ядра электронноплотные, заметно отличаются своими размерами от макромеров (6 и м). Большие темные глыбки хроматина располагаются у края кариолеммы. После образования синцития цитоплазма их разбухает, и в ней постепенно синтезируется кератиновый слой в виде овальных электронноплотных капель, равномерно расположенных по всему краю наружной мембраны (рис., 5—9). Внутреннее содержимое оболочки зернистое, более плотное, чем наружное, и заполнено желточными глобулами и другими органоллами. По мере развития онкосферы этот слой—эмбриофор заметно увеличивается в размерах, приобретая явные признаки морфологической дифференцировки. Слияние периферических кератиновых включений приводит к образованию электронноплотного слоя, однородного снаружи и извитого внутри, с заметными лакунами-порами и митохондриями внутри. Ближе лежащий слой у зародыша значительно превышает его по размеру (в 5 раз), более прозрачен и однороден с большим содержанием мелких овальных митохондрий. В зрелой онкосфере соотношение этих слоев резко изменяется в обратном порядке (рис., 11).

В ранней преонкосфере и на последующих этапах созревания онкосферы заметно образование промежуточного слоя (рис., 10). Первоначально он выявляется в виде пунктирной линии у самого края наружной мембраны внутренней оболочки, затем образует более плотную линию, тесно прилегающую к наружной границе кератинового слоя (рис., 11). В зрелой онкосфере этот промежуточный слой сохраняется в виде однородной субстанции.

Эмбриофор зрелой онкосферы сильно развит и состоит из плотных рядов гексагональных столбиков, в наружной части которых много лакун, содержащих мелкие овальные включения. Внутренний, или зернистый, слой в 3—4 раза меньше кератинового, содержит длинные палочковидные органоллы, имеющие плотные точечные включения.

Оболочка самой онкосферы окружена несколькими тонкими мембранами, прилегающими близко друг к другу. Иногда между ними видны митохондрии и другие труднодифференцируемые органоллы. Внутренняя часть самой онкосферы имеет полость, окруженную микромерами, свободно располагающимися по периферии и контактирующими друг с другом посредством нитевидных цитоплазматических отростков. Цитоплазмы микромеров и их ядер имеют одинаковую электронную плотность с едва заметным контуром ядерной мембраны. В некоторых микромерах различаются более плотные хроматиновые глыбки и ядрышки. Мигрирующие в центральную часть зародыша клетки содержат два овальных электронноплотных ядра, с трудом отличающихся от наружного слоя цитоплазмы. В поздней преонкосфере плотная масса зародыша заметно увеличивается по количеству клеток и окружена двумя четкими наружными мембранами, к которым плотно прилегают

еще три менее электронноплотные оболочки. Между этими оболочками различаются овальные удлиненные тела, митохондрии и другие труднодифференцируемые органонды. Все четыре оболочки извилисты, плотно покрывают зародыш. Границы клеток зародыша ясно различимы, со светлыми межклеточными пространствами. Клетки разного размера, с овальными четкими ядерными контурами, электронноплотной ядрышковой зоной, лежащей либо центрально, либо у карнолеммы с интенсивно плотными глыбками хроматина (рис. 8—9). Формирование и строение внутренней части самого зародыша нами полностью не прослежено.

Таким образом, у исследованных нами видов *T. pisiformis* и *T. hydatigena*, как у большинства циклофилядных цестод, формирование оболочек онкосферы происходит по известной схеме.

Наружная капсула, сформированная еще в овидукте, сохраняется на всем протяжении периода дробления. В преонкосфере она ограничена двумя мембранами. Защитная функция наружной капсулы была изучена ранее [8, 21 и др.] и отмечена ее устойчивость к протеолитическим ферментам. Присутствие в ней митохондрий и различных недифференцированных органондов указывает на более широкие защитные свойства ее.

Формирование наружной оболочки происходит, как у всех тений, за счет 3-х макромеров и желточных клеток [6, 10—12, 19—20, 23, 28, 31], а у других видов родов *Moniezia*, *Diorchis*, *Diococlestus* и *Paricteterotaenia* она образуется за счет двух макромеров [7, 13, 19, 20, 23, 26, 27, 34]. И, наконец, есть группы, у которых эта оболочка создается только 1 макромером [10, 16—17]. Различная клеточная природа наружной оболочки обусловлена сокращенным периодом дробления, что приводит к быстрому развитию паразитической личинки [1, 2, 21]. Клеточная природа наружной оболочки особенно хорошо различима на электронном уровне. Присутствие в наружной оболочке онкосферы крупных липидных вакуолей, желточных гранул, разнообразных по форме и функциям митохондрий, рибосом и других органондов подтверждает важную роль макромеров в обеспечении зародыша энергетическим материалом и питанием. Выполнение секреторной и выделительной функций наружной оболочки подтверждается содержанием в ней выделительных гранул и аппарата Гольджи.

Внутренняя оболочка онкосфер обоих видов также имеет клеточную природу и четко дифференцирована на промежуточный, кератиновый и зернистый слои, представляющие единое целое — эмбриофор, не разграниченный мембранами. Кератиновая реакция наружного слоя эмбриофора и белкового зернистого обнаружена у других циклофилид [4, 28].

Наличие промежуточного слоя между наружной и внутренней оболочками в живых онкосферах было отмечено ранее [3, 5, 19—20, 35]. Наши наблюдения подтвердили его существование и выявили последовательные морфологические изменения в нем в процессе формирования онкосферы. Считаем вполне обоснованным мнение ряда авторов [7, 14, 19—20], согласно которому промежуточный слой является частью



Рис. 1—4. Наружная оболочка саркоплазматического ретикулума *Trisulpha* (ув. $\times 5000$).
 1. Присутствие вклеток микромеров в саркоплазме; 2, 3. мембранные выстилки и желточные гранулы; 4. сохранение наружной капсулы в виде тонкой, электронноплотной мембраны.

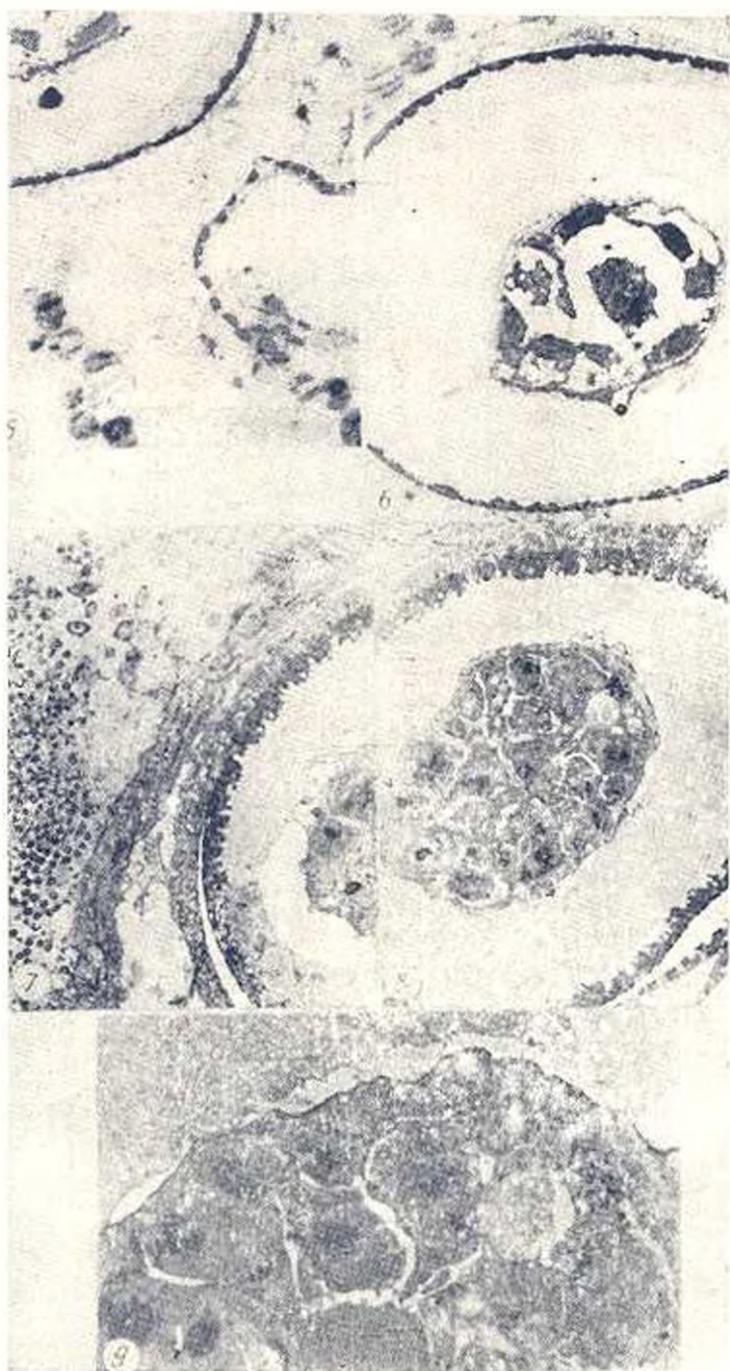


Рис. 5—9. Формирование внутренней оболочки преэмбриона *P. polifacilis* (ув. $\times 5000$). 5. Появление первичных кератиновых гранул на наружной мембране внутренней оболочки; 6. увеличение, разбухание зернистого слоя, формирование однослойного эпителия и миграция в центральную часть двужядерной клетки. Наличие оболочек, покрывающих непосредственно зародыш; 7. Слияние кератиновых гранул, появление в них митохондрии, образование цитоплазматических выростов в наружной оболочке; 8, 9. Клеточная структура зародыша, окруженная густым слоем прилегающих оболочек, ограниченными мембранами.

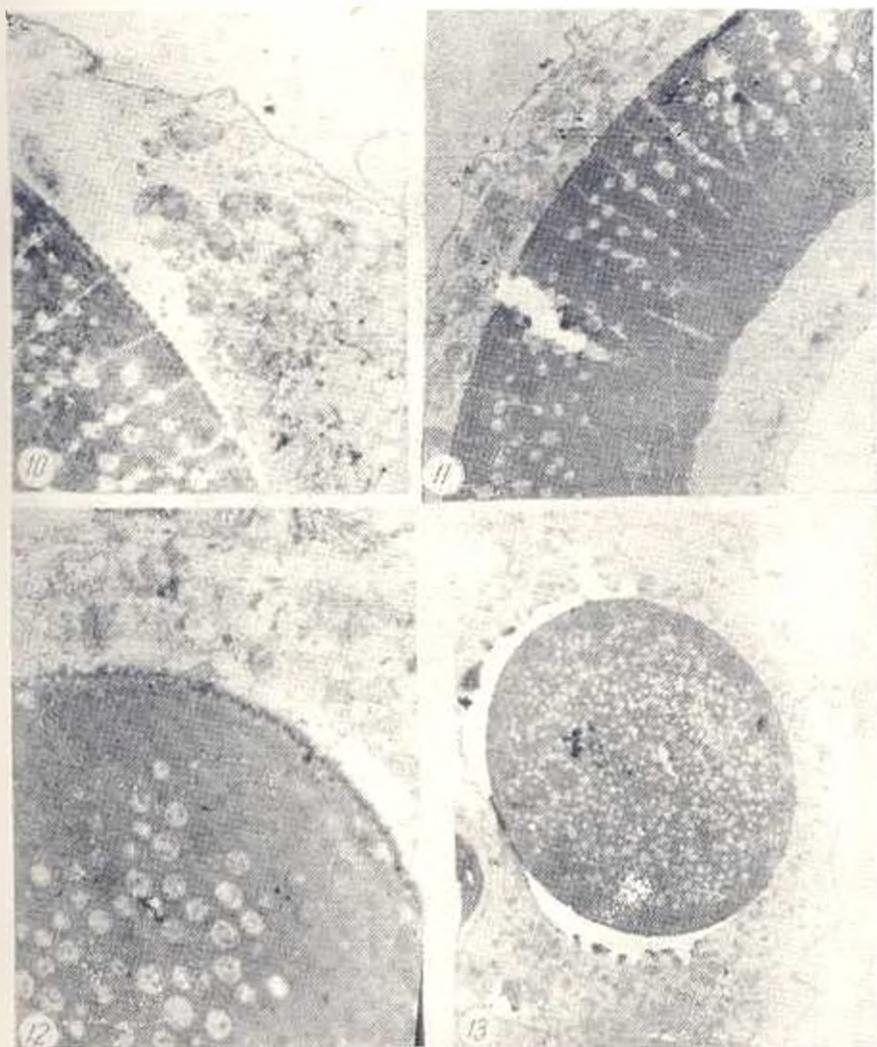


Рис. 10—13. Эмбрифор трематоды *T. ruzicki* (ув. $\times 5000$ — 10000). Сохранение наружной оболочки с множественными включениями, присутствие промежуточного слоя, наличие плотно упакованных рядов кератиновых блоков с порами и митохондриями, сжатие зернистого слоя.

внутренней оболочки и не отделяется мембранами от соседних слоев. Наличие основных четырех оболочек онкосферы описано и для других видов цестод. Соотношение этих слоев у разных видов неодинаково.

С помощью электронной микроскопии удалось различить дополнительные тонкие оболочки, лежащие ниже онкосферной мембраны, окружающей непосредственно зародыш [15]. Так, у *E. granulosis* помимо четырех оболочек обнаружены еще дополнительные мембраны, ограничивающие зону крючков [24, 30]. Полученные нами данные не противоречат сведениям Рибницкой [22] об ультраструктуре онкосферы *H. diminuta*, у которой установлено присутствие еще 4 оболочек вокруг самого зародыша. Однако в нашем материале не удалось просмотреть базальной пластинки.

Дифференциация клеток ранней преонкосферы подтверждает образование однослойного ряда клеток по периферии зародыша, которые Рибницкая [22] рассматривает как эпителиальный слой. Присутствие в центральной части зародыша *T. pisiformis* двуядерной клетки подтверждает также наличие детерминированного, высокоспециализированного типа клеток, который описан у других видов цестод [17, 21] как медулярный сократительный центр. Дальнейшая судьба этих клеток не прослежена в нашем материале.

Полученные данные позволяют прийти к следующему заключению.

Преонкосфера *T. pisiformis* и *T. hydatigena* окружена 7 оболочками: наружной капсулой, наружной оболочкой, внутренней оболочкой, содержащей три слоя (промежуточный, кератиновый и зернистый), и четырех тонких оболочек, покрывающих непосредственно зародыш.

Наружная капсула сохраняется в преонкосфере в виде тонкой двойной мембраны.

Наружная оболочка синцитиальной природы содержит ядра трех макромеров и желточных клеток и разнообразные по форме и структуре органеллы; в зрелой онкосфере она сильно редуцирована.

Внутренняя оболочка образована тремя макромерами, также включает разнообразные органеллы, в ней синтезируется кератин. В преонкосфере зернистый слой заметно преобладает над кератиловым, в зрелой онкосфере их соотношение изменяется в обратном порядке.

Зародыш непосредственно окружен четырьмя оболочками, ограниченными мембранами.

В преонкосфере формируется однослойный эмбриональный эпителий, из которого мигрирует специализированная двуядерная клетка, образующая в зрелой онкосфере медулярный или сократительный центр.

ЛИТЕРАТУРА

1. Базигов А. А. В сою. Зоологические проблемы Сибири, 39—40, Новосибирск, 1972.
2. Базигов А. А. Паразитология, 11, 2, 104—112, Л., 1977.
3. Матвеева Е. М. Тр. ВИНИС, 3, 61, 1938.
4. Пьяльва Л. // Helminthologia, 6, 1—4, 135—144, 1965.
5. Потемкина В. И. Тр. ВИНИС, 3, 97—126, 1938.
6. Benedict P. J., van Arck D. Biol., 2, 183—210, 1881.
7. Bona F. V. Riv. di Parasit., 18, 155—184, 1957.

8. Coll W. H. Zeltschr. Parasitenk., 48, 1, 9—14, 1975.
9. Chew M. W. K. J. Helminthol., 37, 2, 101—113, 1993.
10. Douglas L. T. J. Parasit., 49, 530—558, 1963.
11. Janicki G. Zeitschr. wissen. Zool., 87, 685—724, 1907.
12. Fairweather J. Proc. Brit. Soc. Parasit. Spring Meet. 9—11, April 1979, Parasit., 79, 3, 16, 1979.
13. Moniez H. Memoires sur les Cestodes. Trav. de Inst. Zool. de la station maritime de Wimereux, Paris, 3, 1, 238, 1881.
14. Moriyama S. Jap. J. Parasit., 10, 1—7, 1961.
15. Nieland M. L. J. Parasit., 31, 5, 957—969, 1983.
16. Ogren R. E. J. Parasit., 42, 4, 414—428, 1956.
17. Ogren R. E. J. Parasit., 43, 1, 505, 520, 1957.
18. Ogren R. E. J. Trans. Amer. Micr. Soc., 81, 65—72, 1962.
19. Rybicka K. Acta Parasit. Pol., 12, 313—326, 1964a.
20. Rybicka K. Acta Parasit. Pol., 12, 327—338, 1964b.
21. Rybicka K. Adv. in Parasit., 13, 25—34, 1965.
22. Rybicka K. Parasitology, 66, 1, 9—13, 1973.
23. Saint Remy G. C. R. heb. Seans Acad. Sci. Paris, 132, 43—45, 1901.
24. Sakamoto Tsukasa, Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ., 17, 25, 165—174, 1981.
25. Singh J. P., Baugh S. C. Angew. Parasit., 25, 1, 12—17, 1984.
26. Spätlisch W. Zool. Jahrb. Abt. Anat., 47, 101—112, 1925.
27. Swiderski Z. Exp. Parasit., 23, 103—113, 1968.
28. Swiderski Z. Proc. 50th Jubilee meet. Amer. Soc. Parasitol., 10—14, New Orleans, Louisiana, USA, 1975.
29. Swiderski Z. In: Proc. 2nd Europ. Multicolloquium of Parasitology 1—6 sept 1975, Yugoslavia, Belgrade, 266—272, 1978.
30. Swiderski Z. 1th Intern. Congr., Hamburg, aug., 3, 17—24, 513—514, 1982.
31. Swiderski Z., Eckert J. Parasitology, 79, 2, 19—20, 1977.
32. Swiderski Z., Eckert J. In 4th Intern. Congr. Parasit., 19—26 Aug. 1978, Warszawa, Section "C", 131—132, 1978.
33. Schramtova J., Blazek K., Marchoul L., Singul A. Fol. Parasit., 31, 3, 217—251, 1984.
34. William H., Coll W. H. Proc. Helm. Soc. Wash., 51, 1, 113—120, 1934.
35. Voge M., Berntzen A. K. J. Parasit., 47, 813—818, 1961.

Поступило 18.VI 1986 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 8, с. 650—655, 1986

УДК 576.895.121

ФАУНА ГЕЛЬМИНТОВ ГРАЧЕЙ В АРМЯНСКОЙ ССР

С. О. МОВСЕСЯН, Ф. А. ЧУБАРЯН

Институт зоологии АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация — Обследовано 94 особи грачей в двух ландшафтно-географических зонах Армении — бассейне оз. Севан (горные степи), долине р. Аракс (зона полупустынь Арагатской долины) и Гукасянском районе (горные степи). Обнаружено 9 видов гельминтов. У грачей, обитающих в полупустынной зоне Арагатской долины и Гукасянском районе, найден нематода *Syngamus trachea* (Montagu, 1811). В бассейне оз. Севан указанный вид не обнаружен. Этот факт свидетельствует о возможности очагового распространения данного вида на территории Армении.

Խնամարիտ — 1981—1983 թթ. ՀԽՍՀ երկու բնա-աշխարհագրական գոտիներում՝ Սևանի ավազանում (լեռնա-տափաստանային գոտի) և Արագած հովտում (կի-