

**АКАДЕМИЯ НАУК КАЗАХСКОЙ ССР  
ИНСТИТУТ ЗООЛОГИИ**

На правах рукописи

**ШАЙМАРДАНОВ Жасулан Кудайбергенович**

УДК 576.895.122

**МИКРОМОРФОЛОГИЯ И ФУНКЦИИ  
ЖЕЛТОЧНЫХ КЛЕТОК ТРЕМАТОД  
С РАЗНЫМ ТИПОМ РАЗВИТИЯ**

03.00.19 — паразитология и гельминтология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Алма-Ата — 1985

Работа выполнена в лаборатории функциональной морфологии беспозвоночных животных Института зоологии АН Казахской ССР.

**НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ**

— доктор биологических наук **В. Я. Панин**

**ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ**

— член-корреспондент АН Киргизской ССР, доктор биологических наук, профессор **М. М. Токобаев**

— кандидат биологических наук, старший научный сотрудник **Т. Н. Соболева**

Ведущее учреждение — Кемеровский государственный медицинский институт.

Защита состоится « 28 » НОЯБРЯ 1985 г. на заседании Специализированного Совета К.008.17.01 при Институте зоологии АН Казахской ССР.

Адрес: 480032, Алма-Ата, Академгородок, Институт зоологии АН КазССР.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института зоологии Академии Наук Казахской ССР.

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 1985 г.

**Ученый секретарь  
Специализированного Совета  
доктор биологических наук**

**Э. И. ПРЯДКО**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Своеобразие и сложность строения половой системы плоских червей уже давно привлекает пристальное внимание исследователей. Это не случайно, так как эволюция эндопаразитических организмов, в том числе трематод, тесно связана с возрастанием их половой продуктивности.

По интенсивности выделения половых продуктов трематоды занимают одно из первых мест в животном мире, например, одна особь *Fasciola hepatica* за неделю выделяет около одного миллиона яиц (Шульц, Гвоздев, 1970). Чем выше плодовитость паразитов и устойчивость их яиц к воздействию внешней среды, тем больше вероятность успешного расселения и заражения хозяев.

В связи с этим эффективность направленной борьбы с опасными гельминтозами человека и сельскохозяйственных животных в немалой степени зависит от репродуктивного потенциала гельминтов и их устойчивости к химиопрепаратам.

В основе специфического действия антгельминтиков лежат особенности биохимического строения и обмена паразита (Сепрунов, 1971). Для подбора антгельминтиков, подавляющих или угнетающе действующих на половую систему трематод, необходимо знать функциональные особенности разных отделов половой системы трематод.

Высокая плодовитость паразитических червей обусловлена темпами эмбрионального развития, которые определяются наличием достаточного количества запасных питательных веществ, необходимых для осуществления эмбриогенеза личинок и обеспечения их нормального существования во внешней среде.

У трематод основным поставщиком запасных питательных ве-



цесты, используемых период эмбрионального развития, являются желточные клетки. Они принимают также участие в процессе формирования скорлупы яиц. Изучение микроморфологических и гистохимических особенностей желточных клеток представляет интерес с точки зрения разработок рекомендаций по подбору антгельминтиков, подавляющих или нарушающих процесс формирования скорлупы яиц.

Цель и задачи исследования. Целью исследования явилось выявление роли желточных клеток трематод в питании развивающихся личинок и образовании скорлупы яиц в зависимости от онтогенеза развития.

Изучались следующие вопросы:

1. Микроморфология и ультраструктура желточных клеток трематод с разным типом эмбриогенеза.
2. Гистохимический анализ желточных клеток трематод с разным типом развития.
3. Роль желточных клеток в накоплении запасных питательных веществ у личинок и в формировании скорлуповой оболочки яйца.

Структура и функция желточных клеток трематод, эмбриогенез которых завершается в организме материнской особи, изучали на примере *Dicrocoelium lanceatum* (Stiles et Nassal, 1896), *Fleishmannosus sibiricus sibiricus* Iswaitschikoff, 1927, *Gorgoderia amplicava* Loos, 1899.

Модельными объектами изучения этих же вопросов у трематод, эмбриогенез которых завершается во внешней среде, были следующие виды: *Liorchis scotiae* (Willmolt, 1950), *Opisthoglyphe ranae* (Proelich, 1791), *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819) Braun, 1893.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые на светооптическом уровне проведены сравнительно-морфологические и гистохимические исследования желточных клеток трех видов трематод: *D. lanceatum*, *P. s. sibiricus*, *L. scotiae*.

Впервые изучено распределение нейтральных и кислых мукополисахаридов, гликогена, липидов, основных белков, тирозина, дисульфидных и сульфгидрильных групп белков, фенолов и фенолаз в желточных клетках этих трематод.

Впервые на электронно-микроскопическом уровне исследованы желточники пяти видов трематод: *D. lanceatum*, *P. s. sibiricus*, *G. amolicava*, *O. ranae*, *D. spatulaceum*.

Комплексное использование гистологических, гистохимических и электронно-микроскопических методов позволило более достоверно изучить структуру и функции желточных клеток. Рассмотрены особенности образования скорлупы яиц у этих трематод.

Результаты морфологических и гистохимических исследований желточных клеток и анализ процессов образования яиц у изученных видов трематод существенно дополняют имеющиеся данные по этим вопросам. Они могут быть использованы при чтении курсов по паразитологии, гельминтологии, зоологии беспозвоночных, общей биологии в ветеринарных, медицинских, педагогических институтах и университетах.

Полученные гистохимические данные могут служить основой для подбора более эффективных антгельминтиков, специфически действующих на процессы формирования яиц у соответствующих видов трематод.

Данная работа является частью плановых исследований лаборатории функциональной морфологии беспозвоночных животных.

Института зоологии АН КазССР по теме "Структурно-функциональные особенности токсоплазмид и трематод различных экологических групп".

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседании Общества паразитологов Казахстана (Алма-Ата, 1985); на совместном заседании лаборатории функциональной морфологии беспозвоночных животных и экологической паразитологии Института зоологии АН КазССР (Алма-Ата, 1985).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 126 страницах, состоит из введения, четырех глав, выводов, содержит 66 рисунков, 6 таблиц. Список использованной литературы состоит из 38 отечественных и 90 иностранных источников.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### I. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для исследования были взяты 6 видов трематод, относящихся к пяти семействам и пяти подотрядам: *Gorgoderia amplicava* - сем. *Gorgoderidae* Loos , 1911, подотр. *Fasciolata* Skrjabin et Schulz , 1935; *Lierchia scotiae* - сем. *Paramphistomidae* Fischöder , 1901, подотр. *Paramphistomata* ( Szidat , 1936); *Pneumonoceres sibiricus sibiricus* , *Opisthioglyphe ranae* - сем. *Plagiorchidae* Lühe , 1911, подотр. *Plagiorchinata* La Rue , 1957; *Dicrocoelium lanceatum* - сем. *Dicrocoeliidae* Odhner, 1911, подотр. *Dicrocoeliata* Panin , 1971; *Diplostomum spatulaceum* - сем. *Diplostomidae* ( Peirier , 1886), подотр. *Strigeata* La Rue, 1926.

Ультраструктура желточных клеток изучалась у следующих видов трематод: *D.lanceatum* из печени овец, *O.ranae* из

кишечника, *P.s.sibiricus* из легких и *G.amplivava* из мочевого пузыря озерной лягушки (*Rana ridibunda*), *D.spathaceum* из кишечника серебристой чайки (*Larus argentatus*).

Сравнительно - гистохимические исследования были проведены на следующих видах: *L.scotiae* из рубца крупного рогатого скота, *D.lanseatum*, *P.s.sibiricus*. Гистохимия желточников двух других видов - *O.ganae* и *D.spathaceum* - достаточно освещена в литературе (Гинецинская, Добровольский, 1962, 1963; Гинецинская, 1968; Гинецинская и др., 1971; Егастус, 1972), поэтому мы ограничились изучением только ультраструктуры этих видов трематод.

Фиксирующие смеси и режим фиксации трематод подбирали в зависимости от целей исследования. Для электронно-микроскопического изучения трематод фиксировали в 3% глутаровом альдегиде на какодилатном буфере (pH 7,4) при 4°C, дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия на том же буфере. При обезвоживании материал контрастировали уранилацетатом в 70° спирте. В качестве заливочной среды использовали эпоксидные смолы арадит и эпон 812. Ультратонкие срезы получали стеклянным ножом на микротоме Райхерта и ЛКВ. Срезы дополнительно контрастировали цитратом свинца по Рейнольдсу и исследовали на электронном микроскопе УЭМВ-100 К и ЛЕМ - 100В.

Для гистохимического анализа были использованы следующие фиксаторы: 10% нейтральный формалин, 80° и 90° этиловый спирт, 80° и абсолютный ацетон, смеси Бейкера, Карнуа, Росманн. Фиксацию производили при 4°C в течение 16-24 часов. Трематод заливали в парафин.

Для морфологического изучения срезы толщиной 7-10 мкм

окрашивали гематоксигин-эозином по Карацци, по Романовскому-Гимза и по Маллори.

При исследовании на фермент полифенолоксидазу трематод фиксировали в 4% растворе формальдегида на 0,1 М фосфатном буфере при +4°C в течение 2-х часов. Промывали в 5% растворе сахарозы, обезвоживали в ацетоне восходящей концентрации и заливали в легкоплавкий парафин.

В некоторых случаях живых или предварительно фиксированных гельминтов тотально окрашивали на полифенолоксидазу по Лойду (1982) и далее их заливали в парафин, раскладывали на срезы толщиной 7-10 мкм, депарафинировали и заключали в канадский бальзам или в полистирол.

Для выявления белков применили метод сулема - бромфеноловый синий (БФС) по Бонхегу (Пирс, 1962) и малахитовый зеленый по Смитту (Smyth, 1951). Тирозин определяли по Морель-Сисли,  $\text{NH}_2$ -группы по Ясума, Итчикава, SH-группы по Шевремоню, Фредерику, s-s-группы по Пирсу (1962) и Madhavi (1971). Контрольные препараты в зависимости от основного метода обрабатывали в дезаминирующей смеси по Пирсу или в растворах 0,1 М моноiodуксусной кислоты (МИА), Грама, Шиффа, 3% альцианового синего. ДНК выявляли по Феттгену с применением холодного гидролиза (Логачев, 1965), РНК по Эйнарсону. Контрольные срезы обрабатывали в 1N HCl при 60° в течение 7 минут. Гликоген, нейтральные мукополисахариды определяли с помощью ШИК-реакции по Мак-Манусу. Контроль: реактив Шиффа, амилаза слюны при 37° в течение 30 мин., ацетилование, дезацетилирование. Кислые мукополисахариды выявляли сочетанной окраской альцианового синего и сафранина (Виноградов, 1973). Липиды



определяли окраской суданом черным В. Веществе фенольной природы диазореакцией по Смитту (1956). Полифенолоксидазу по Смитту (1954), Бейкеру (Ширс, 1962) и Лойду (1982). Контроль инкубация без субстрата, термоинактивация при 90° в течение 15 минут, ингибирование в 0,01 М растворе ДДС.

Препараты изучали на микроскопах "Jenaval" (ГДР) и "Polarar" (Австрия). Для фотографирования использовали автоматические фотонасадки выше названных микроскопов. Для съемок применяли пленки КН-1, Микрат-300, УТ-18 и НС-19. Всего было изучено 4000 препаратов, получено 210 электроннограмм.

## 2. МИКРОМОРФОЛОГИЯ, УЛЬТРАСТРУКТУРА И ГИСТОХИМИЯ ЖЕЛТОЧНЫХ КЛЕТОК ТРЕМАТОД С ИНКЛЮЗИОНАЛЬНЫМ ТИПОМ РАЗВИТИЯ

### 2.1. Микроморфология, ультраструктура и гистохимия желточных клеток *Dicrocoelium lanceatum*

Микроморфология. Желточные фолликулы образованы клетками, находящимися на разных стадиях развития. Незрелые желточные клетки имеют большое ядро относительно объема цитоплазмы. Размеры ядра 1,2-1,6 мкм, а диаметр клетки 1,5-2,0 мкм. В желточных фолликулах наблюдаются клетки на разных стадиях митоза. Видимо, эти клетки являются стволовыми. По мере созревания в цитоплазме желточных клеток происходят определенные структурные изменения, появляются мелкие гранулы, которые постепенно оформляются в глобулы. Ядро зрелой желточной клетки 1,5-2,0 мкм, а диаметр клетки 3,4-4,1 мкм.

Ультраструктура. Оболочка желточных фолликулов образована отростками паренхиматозных клеток. Они встречаются и между желточными клетками. Развитие желточных клеток характеризуется прогрессирующей грануляцией, изменениями в количестве

и структуре клеточных компонентов. Незрелые клетки имеют крупное ядро, в цитоплазме их имеются мелкие митохондрии, цистерны агранулярного эндоплазматического ретикулума и большое количество свободных рибосом и полисом.

В развивающихся желточных клетках появляются густая сеть гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГЭР), сосредоточенного ближе к периферии клеток. Вблизи его каналов начинают формироваться скорлуповые гранулы. Они представляют собой округлые электронно-плотные структуры, заключенные в глобулы с гладкой однослойной оболочкой. При возрастании количества гранул они приобретают неправильную форму, а глобулы увеличиваются в размере. Иногда соседние глобулы сливаются друг с другом. Митохондрии встречаются в участках цитоплазмы, свободных от глобул, а также среди каналов ГЭР.

По мере развития желточных клеток относительный объем ядер уменьшается, а скорлуповых глобул увеличивается. Ядро становится неправильной формы вследствие сдавливания его глобулами. Наблюдаются расположенные параллельно друг другу каналы ГЭР. Четко выраженных элементов комплекса Гольджи не отмечено. Появляются крупные липидные капли. Желточные клетки окружены отростками клеток паренхимы. Как в отростках, так и в ячеех между ними имеются скопления гранул гликогена. В желточных клетках гликоген отсутствует.

Зрелые желточные клетки заполнены скорлуповыми глобулами. Ядра их смещаются к периферии клетки. В среднем в желточной клетке имеются 5-8 крупных глобул с многочисленными гранулами различной формы. ГЭР сильно развит, каналы его располагаются в свободных участках цитоплазмы. Липидных капель мало, гликоген отсутствует.

Гистохимия. БФС и мадакитовым зеленым на основные белки молодые желточные клетки окрашивали умеренно, а зрелые интенсивно. Скорлупа и содержимое яиц и проксимального отдела матки окрашена умеренно, а яйца из дистального отдела не окрашиваются. Контрольное окрашивание с БФС после дезаминирования по Цирсу показывает снижение интенсивности окраски в зрелых клетках, что свидетельствует о присутствии  $\text{NH}_2$ -групп белков. Это подтверждается результатом нингидрин-шиффа реакции. Скорлупа незрелых яиц имеет такую же окраску. Ферри-ферриционидная реакция на SH-группы была интенсивной в зрелых и умеренной в молодых клетках. Скорлупа и содержимое незрелых яиц окрашена в умеренно синий цвет. Скорлупа зрелых яиц не окрашивается. Реакция Морель-Сисли на тирозин, диазореакция по Смитсу на фенолы были положительны.

ШИК-реакция в желточных клетках была отрицательной, а в ячеех и отростках клеток паренхимы - положительной. После обработки срезов амилазой наблюдается исчезновение окраски, что свидетельствует о присутствии гликогена. Судан черный В на жиры дал слабую положительную реакцию в зрелых клетках. Все три теста на полифенолоксидазу были позитивны.

Таким образом, скорлуповые глобулы желточных клеток ди- кроцелии состоят из основных белков связанных с амино- и сульфгидрильными группами, тирозина, фенолов и полифенолоксидазы. Гликоген в желточных клетках не обнаружен, хотя в большом количестве он имеется в ячеех и отростках клеток паренхимы, окружающих желточные фолликулы. Он обнаружен также в зрелых яйцах. Жир в небольшом количестве выявляется только в зрелых клетках.

2.2. Микроморфология, ультраструктура и гистохимия  
желточных клеток  
*Pleurospores sibiricus sibiricus*

Микроморфология. Желточные фолликулы содержат клетки разных стадий развития. Молодые желточные клетки 3-4 мкм в диаметре, содержат крупное ядро с небольшим ядрышком. Цитоплазма базофильная. По мере созревания объем клеток увеличивается, а базофильность уменьшается. При окраске гематоксилин-эозином цитоплазма клеток приобретает светло-розовый цвет, а ядро - темно-фиолетовый. Желточные клетки, окрашенные по Маллори, ярко-оранжевого цвета. Зрелые желточные клетки 6,5-7,5 мкм в диаметре. Скорлуповые глобулы, ядро и другие клеточные компоненты локализованы по периферии цитоплазмы.

Ультраструктура. Незрелые желточные клетки характеризуются небольшим объемом цитоплазмы, содержащей крупное ядро, большое количество свободных рибосом, митохондрии с хорошо выраженными кристами и светлым матриксом. В некоторых клетках вблизи ядра отмечены цетриоли. Эндоплазматическая сеть редкая, гликоген и липидные капли не выявлены.

Дальнейшее развитие желточной клетки сопровождается увеличением размеров и перестройкой элементов ГЭР. Параллельно расположенные каналы его образуют электронно-плотные области эргастоплазмы. Здесь формируются скорлуповые гранулы. Липидные капли единичны. Зрелые желточные клетки имеют большой объем цитоплазмы, которая содержит густую сеть ГЭР. Крупные скорлуповые глобулы с плотно упакованными гранулами локализуются на периферии клеток. Липидных капель мало, гликоген не выявлен.

Гистохимия. Цитоплазма желточных клеток при окраске БФС

дает позитивные результаты. Ферри-феррицианидная реакция на сульфгидрильные группы белков дала положительные результаты. Реакция Ясума-Итчикава на  $\text{NH}_2$ -группы в незрелых желточных клетках была слабой, а в зрелых - интенсивной. Реакция Фельгена на ДНК дала специфичное окрашивание только в ядрах. Реакция Эйнарсона на нуклеиновые кислоты была интенсивной в незрелых и слабой в зрелых клетках. Реакция Морель-Сисли на тирозин дала отрицательные результаты. Диазореакция Смита на фенолы была положительной. Результаты двух реакций на дисульфидные группы свидетельствуют о низком содержании их в желточных клетках. Для выявления полифенолоксидазы использованы реакции Бейкера, Лойда и Смита. Все они дали положительные результаты. Реакция с альциановым синим и сафранином на кислые мукополисахариды дала отрицательные результаты. Шифф-йодная реакция Мак-Мануса показала, что гликоген в желточных клетках отсутствует. Реакция с суданом черным В на липиды была отрицательной.

Таким образом, желточные клетки содержат белки основной природы связанные с амино- и сульфгидрильными группами, полифенол-оксидазу. Гликоген и липиды не выявлены.

### 2.3. Ультраструктура желточных клеток *Gorgoderia amplivava*

Желточные клетки в фолликулах располагаются плотно друг к другу. Незрелые клетки размером  $5,64 \times 7,52$  мкм. Цитоплазма клеток почти однородная, мелкозернистая, содержит множество мелких свободных рибосом. Гликоген и липиды отсутствуют.

Митохондрии равномерно рассеяны в цитоплазме клеток, матрикс их светлый. В цитоплазме некоторых клеток отмечены центриоли, что свидетельствует о наличии митоза в желточных клетках.

Развитие желточных клеток сопровождается увеличением объема цитоплазмы и появлением отдельных скорлуповых гранул. В участках образования скорлуповых гранул отмечаются единичные короткие каналы ГЭР. Хроматин в ядрах конденсируется, образуя крупные плотные глыбки по периферии ядер. Количество ядерных пор заметно увеличивается. Ядрышки остаются диффузными.

Размеры зрелых желточных клеток 9,4 x 11,3 мкм. Количество гранул в цитоплазме клеток значительно увеличивается, они группируются в скорлуповые глобулы. Каждая глобула содержит от одного до нескольких десятков мелких сферических гранул, лежащих плотно друг к другу. Некоторые глобулы состоят из одной-двух крупных неправильной формы гранул и нескольких более мелких сферических. В зрелых желточных клетках электронно-микроскопическим методом гликоген не выявлен. Характерной особенностью желточных клеток *G. amplicava* является наличие большого количества свободных рибосом почти на всех стадиях развития.

### 3. МИКРОМОРФОЛОГИЯ, УЛЬТРАСТРУКТУРА И ГИСТОХИМИЯ ЖЕЛТОЧНЫХ КЛЕТОК ТРЕМАТОД С ЛИБЕРОЛЯРВАЛЬНЫМ ТИПОМ РАЗВИТИЯ

#### 3.1. Микроморфология и гистохимия желточных клеток *Liorchis scotiae*

Микроморфология. Стенки желточных фолликулов тонкие, по Маллори окрашиваются в синий цвет, как и отростки паренхимных клеток. Молодые клетки 10-12,5 мкм в диаметре с диф-

фузно окрашенной цитоплазмой. Зрелые желточные клетки I7-2I,7 мкм в диаметре. Скорлуповые глобулы гематоксилином либо не окрашиваются, либо окрашиваются в слабо желтый цвет. По Маллори глобулы окрашиваются в желто-оранжевый цвет. Ядра зрелых клеток обычно оттеснены глобулами к периферии клеток. Цитоплазма молодых и зрелых клеток не окрашивается малахитовым зеленым, а ядра и скорлуповые глобулы зрелых клеток окрашены в зеленый цвет.

Желточные клетки в фолликулах обычно сохраняют свою целостность, однако в желточных протоках встречаются как целые, клетки, так и отдельные скорлуповые глобулы. Следовательно, разрушение зрелых желточных клеток и выход из них глобул могут происходить еще в период прохождения клеток по желточным протокам. В желточном резервуаре встречаются и целые клетки и скорлуповые глобулы.

Гистохимия. При окрашивании БФС на основные белки скорлуповые гранулы дают окраску от интенсивно голубого до темно-синего цвета. Скорлупа яиц в проксимальном отделе матки светло-синего цвета, а в дистальном участке и гермафродитном протоке не окрашена, содержимое яиц синего цвета. После проведения контрольного дезаминирования по Пирсу с последующей окраской БФС снижения интенсивности окрашивания не наблюдалось. Это демонстрирует отсутствие или наличие в желточных клетках незначительного количества белков, связанных с аминокетонами.

Реакция нингидрин-шифф дала очень слабое окрашивание, что свидетельствует о низком содержании в скорлуповых глобулах желточных клеток белков, связанных с аминокетонами. Ферри-феррицианидная реакция на сульфгидрильные группы белков

слабо выражена, что демонстрирует низкое содержание SH-групп в скорлуповых глобулах. Скорлупа яиц не окрашивается. Реакция Морель-Сисли на тирозин дала положительные результаты. Окрашивание срезов суданом черным В не выявило в желточных клетках липидов.

Для выявления белков, связанных с дисульфидными группами, нами использованы реакции Мадхави и Ширса, которые дали положительные результаты. Это свидетельствует о наличии кератина в скорлуповых глобулах желточных клеток и в скорлупе яиц. Окраска альциановым синим и сафранином на кислые мукополисахариды была отрицательной. Цитоплазма желточных клеток и клеток паренхимы ШИК-положительна. Инкубация срезов в течение 30 минут в амилазе слюны при 37° дала резкое снижение интенсивности окрашивания, что свидетельствует о наличии гликогена. Скорлуповые глобулы не окрашиваются.

Реакция Эйнарсона на нуклеиновые кислоты в цитоплазме незрелых клеток была интенсивной, а в зрелых клетках, находящихся в желточных протоках - отрицательной. Реакция Фельгена на ДНК была позитивной только в ядрах желточных клеток.

Таким образом, скорлуповые глобулы желточных клеток *L. scoticus* содержат основные белки, тирозин, цистин и в очень малом количестве белки, связанные с амино- и сульфгидрильными группами. Полифенолоксидаза отсутствует. Гликоген обнаружен в значительном количестве в зрелых желточных клетках и в яйцах. Липиды в желточных клетках не обнаружены.

### 3.2. Ультраструктура желточных клеток *Opisthioglyphe ranae*

Незрелые желточные клетки овальной формы, имеют крупное ядро и малый объем цитоплазмы, которая содержит большое коли-



чество свободных рибосом и митохондрии. Имеются оба вида эндоплазматического ретикулума. Каналы ГЭР короткие. В некоторых клетках в цитоплазме, около ядра, встречаются центриоли.

По мере дифференциации форма и структура желточных клеток изменяется, однако ядра по форме и размерам остаются почти такими же как у незрелых клеток. В цитоплазме появляются скорлуповые глобулы, количество гранул в которых варьирует от трех-четырёх до нескольких десятков. Появляются липидные капли, количество которых постепенно увеличивается до нескольких десятков. В области расположения липидных капель отмечаются митохондрии с темным матриксом и нечетко выраженными кристами. Количество элементов ГЭР в цитоплазме клеток уменьшается.

Зрелые желточные клетки по размерам примерно в два раза больше незрелых. Цитоплазма их уже менее однородная. Ядра округлые, наружная поверхность их мембран усеяна многочисленными рибосомами. Цитоплазма клеток содержит большое количество примерно одинаковых по величине скорлуповых глобул, ограниченных тонкой мембраной, а также липидные капли и митохондрии.

В цитоплазме зрелых клеток имеются структуры, похожие на рибосомальные комплексы. Они электронно-плотные, окружены тонкой оболочкой. В некоторых комплексах имеются извитые тяжи электронно-плотного материала с узкими светлыми промежутками между ними; в других - тяжи деформированы и они заполнены мелкогранулярным веществом. Рибосомальные комплексы локализируются между желточными глобулами, вблизи групп липидных капель. Возможно, они принимают участие в синтезе запасных

питательных веществ, так как в основном около них и между липидными каплями отмечаются скопления гранул гликогена.

Характерной особенностью желточных клеток *O. ganae* является наличие в них большого количества липидов и относительно малого количества скорлупового материала в глобулах.

### 3.3. Ультраструктура желточных клеток *Diplostomum spathaceum*

Недифференцированные клетки небольшого размера, овальные или неправильной формы. Ядра их крупные с диффузными ядрышками. На внутренней мембране ядра локализуются различной величины глыбки конденсированного хроматина. Цитоплазма клеток однородная по плотности, содержит большое количество свободных рибосом. Гликоген, липиды и элементы ГЭР отсутствуют.

Развивающиеся желточные клетки характеризуются увеличением размеров и объема цитоплазмы. Ядра постепенно приобретают неправильную форму. Появляются каналы ГЭР с многочисленными рибосомами на их наружной мембране. В участках цитоплазмы с ГЭР формируются скорлуповые гранулы. Гликоген в цитоплазме таких клеток не выявляется, встречаются единичные липидные капли.

Зрелые желточные клетки крупные, удлинненно-овальной формы. Ядро занимает сравнительно небольшой участок цитоплазмы, она мелкозернистая, более электронно-плотная, чем у незрелых клеток; содержит свободные рибосомы и каналы ГЭР, которые локализируются в участках, свободных от скорлуповых глобул. Митохондрий мало, они крупные со светлым матриксом и единичными кристами. Скорлуповые глобулы занимают почти весь объем цитоплазмы зрелых желточных клеток, но наибольшие их скопле-

ния отмечаются на полюсах.

В периферических участках некоторых зрелых желточных клеток имеются структуры, содержимое которых образует кольцевидные или спиралевидные завитки электронно-плотного материала. На некоторых срезах можно видеть, что эти структуры формируются за счет вещества скорлуповых глобул. Возможно, что в части созревших желточных клеток соответствующая перестройка скорлупового материала происходит еще до выделения клеток из желточных фолликулов в протоки. В цитоплазме зрелых желточных клеток выявляются небольшое количество липидов в виде капель. Гликоген не выявлен. Цитоплазма зрелых клеток содержит рибосомальные комплексы, окруженные тонкой оболочкой.

Характерной особенностью зрелых желточных клеток *D. spatulaceum* является наличие в них миелиноподобных структур и рибосомальных комплексов.

#### 4. АНАЛИЗ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Желточные фолликулы исследованных видов трематод состоят из клеток, на разных фазах развития. В цитоплазме незрелых желточных клеток *P. sibiricus* и *G. amplicava* вблизи ядра отмечены центриоли, что указывает на подготовку клетки к митотическому делению. Различные фазы митоза желточных клеток описаны ранее у *P. hepatica* (Stephenson, 1947), *C. cerri-gia* (Начева, Панин, 1984), *Probalitrema californiense* (Marxell, 1943). Цитоплазма незрелых желточных клеток *D. lanceatum*, *P. sibiricus* и *L. scotiae* при окраске гематоксилин-эозином проявляет базофилию. При изучении ультратон-

ких срезов отмечено преобладание в цитоплазме клеток свободных рибосом и митохондрий, т.е. клеточных оргanelл, богатых РНК. Наличие базофильной цитоплазмы является характерным для клеток, продуцирующих протеины (Робертис с соавт., 1973). Некоторые исследователи проводят тесную связь базофильного материала с возникновением скорлуповых глобул (Guraya, 1970; Irwin, Threadgold, 1970).

Дифференциация желточных клеток трематод характеризуется развитием ГЭР, который у исследованных нами видов трематод имеет различную форму и расположение. Так, у *D.lanceatum*, *P.sibiricus* и *D.spathaceum* в зрелых желточных клетках наблюдаются скопления хорошо развитых параллельно расположенных цистерн ГЭР, а у *G.amplivava* они менее развиты. В цитоплазме желточных клеток *O.ganae* на ранних стадиях развития отмечены оба вида эндоплазматической сети: гладкая и гранулярная, которые в зрелых клетках не выявляются. Базофилия зрелых желточных клеток обусловлена именно наличием ГЭР, в каналах которого синтезируются скорлуповые гранулы. Дальнейший процесс формирования скорлуповых гранул сопровождается их слиянием и образованием скорлуповых глобул.

Результаты гистохимических тестов с БФС, малахитовым зеленым, нингидрин-шиф и ферри-феррицианидной реакцией показали, что скорлуповые глобулы *D.lanceatum* и *P.sibiricus* состоят из основных белков, связанных с амино- и сульфгидрильными группами. Основные белки также имеются в желточниках *L.scetiae*, но они связаны с дисульфидными группами. На присутствие основных белков в скорлуповых глобулах многих видов трематод указывают ряд исследователей (Smyth, Clegg, 1959;

Nellen , 1971 ; Coil , 1972 ; Sharma , 1979 ; Богомолова, Павлова, 1961 ; Гинецинская, Лукшина, 1979 ; Начева, Гребенников, 1982). выявлены некоторые отличия в форме, размерах, количестве и плотности упаковки гранул в скорлуповых глобулах. В скорлуповых глобулах *D.spathaceum* имеются мелкие электронно-плотные гранулы, внешне похожие на таковые ; описанные у *F.hepatica* ( Irwin , Threadgold , 1970) и *Pharyngostomoides procyonis* ( Grant et. al. , 1977). С.Ирвин и Л.Тредгольд (1970) считают, что эти образования содержат фенолазу.

В процессе развития скорлуповых глобул участвуют, видимо, и митохондрии в качестве поставщиков энергии для синтеза гранул. Об этом можно судить по изменению структуры митохондрий и их локализации в незрелых и зрелых желточных клетках. В первом случае митохондрии равномерно рассредоточены по цитоплазме клеток и имеют хорошо выраженные кристы, во втором - часть митохондрий тесно связана с участками эргастоплазмы с интенсивным синтезом гранул и не имеет четко выраженных крист.

Имеются данные о том, что желточные фолликулы некоторых трематод содержат питательные клетки, функция которых связана с транспортом питательного материала из паренхимы к желточным клеткам ( Irwin , Threadgold , 1970 ; Matricon-Gendgan , 1978). У изученных нами электронно-микроскопическим методом пяти видов трематод питательные клетки не обнаружены. Однако, в желточных фолликулах *D.lanceatum* , *P.s.sibiricus* , *S.amplivava* , *O.ranae* , *D.spathaceum* имеются многочисленные отростки клеток паренхимы, глубоко проникавшие в

них и как бы обволакивающие желточные клетки. В отростках клеток паренхимы встречаются многочисленные митохондрии, дис-терны агранулярного эндоплазматического ретикулула, липидные капли и глыбки гликогена.

Активно развивающиеся и зрелые желточные клетки *D. spat-haceum* и *O. ranae* содержат рибосомальные комплексы, в от-дельных участках которых просматриваются плотно упакованные структуры ГЭР. Рибосомальные комплексы отсутствуют в незре-лых клетках. Аналогичные структуры отмечены у фасциолы пече-ночной ( Bjorkman , Thorsell , 1968 ; Irwin , Threadgold , 1970), *S. mansoni* ( Erasmus , 1973), *Pharyngostomoides pro-cyenis* ( Grant , Harkema , Muse , 1977). По мнению послед-них авторов, они состоят из ГЭР. С. Ирвин и Л. Тредгольд ( 1970) обнаружили в рибосомальных комплексах *F. hepatica* гликоген, у *S. mansoni* они были ШИК-отрицательны ( Erasmus , 1973 ). Функциональное значение этих комплексов не ясно. Известно, что в формировании скорлупы яиц не принимают участие ( Irwin, Threadgold , 1970).

ШИК-реакция по Мак-Манусу показала отсутствие гликогена в желточных клетках *D. lanceatum* и *P. sibiricus* и его на-личие у *L. scotiae*. Внутренний слой оболочки яйца у дикроце-лия и пневмониецеса был ШИК-позитивным. При обработке амила-зой слюны окраска не снималась, следовательно, это не глико-ген. Контрольные реакции показали, что окрашивание обусловле-но нейтральными мукополисахаридами.

Желточные клетки *D. lanceatum* , *P. sibiricus* и *L. sce-tiae* в реакции с суданом черным В окрашиваются очень слабо, либо не окрашиваются, однако электронно-микроскопическим ме-

тодом у первых двух видов, а также у *D. spathaceum* единичные липидные капли в цитоплазме клеток выявляются. Они, видимо, экскреторной природы. Липиды желточных клеток *O. gahae* могут использоваться как запасные питательные вещества во время развития личинок данного вида во внешней среде.

Исследования Т.А. Гинецинской с соавторами (1965, 1968, 1971, 1979), показали, что содержание запасных питательных веществ в желточниках трематод строго закономерно и обусловлено особенностями биологии развития. Считается, что если эмбриогенез мирацидиев происходит во внешней среде, то в желточных клетках накапливается большое количество запасных питательных веществ. Если же этот процесс завершается в организме материнской особи, то запасные питательные вещества в желточных клетках не откладываются. В последнем случае снабжение зародышей питательными веществами выполняют стенки матки и паренхима.

Функция желточных клеток трематод тесно связана с формированием яичевой оболочки, так как все компоненты сложного яйца, синтезируются в желточных клетках. Используемые в работе методы и полученные результаты по гистохимии желточных клеток позволяют нам затронуть некоторые стороны процесса формирования скорлуповой оболочки у них.

Известно, что скорлупа яйца у многих видов трематод представляет собой хинон-дубильный белок или склеротин (Smyth, Clegg, 1959). Однако, не все виды трематод имеют хинон-дубильную оболочку яйца, у некоторых видов полифенолоксидазы, необходимая для образования склеротина отсутствует. Р. Мадхави (1966, 1968), считает, что у парамфистоматид скор-

лупа яиц кератиновая. По нашим данным, пифеноксидаза содержится в скорлуповых глобулах и оболочке молодых яиц *D.lanceatum* и *P.s.sibiricus*, но отсутствует в желточных клетках *L.scotiae*.

Д.Девеллин (цит. по Nollen, 1971) считает, что различия в химическом составе скорлупы сложных яиц связаны с локализацией гельминтов. Анализ литературных и собственных данных по зависимости типа скорлупы яйца от локализации трематод не подтверждает это мнение. Так, у *L.scotiae* (паразита рубца крупного рогатого скота) отсутствует хиноновое дублирование скорлупы яиц. У *F.hepatica* (паразита желчных ходов печени млекопитающих) скорлупа яйца также не склеротиновая (Ramalingam, 1973). Т.А.Гинецинская и Л.Ш.Лукшина (1979) предполагают, что причиной этому может быть характер биологии развития трематод.

Полученные результаты свидетельствуют, что у *D.lanceatum* и *P.s.sibiricus* (трематод с инклюзиолярвальным типом развития) скорлупа зрелых яиц склеротиновая, и, следовательно, она непроницаема. В желточных клетках этих видов трематод нет гликогена, но в то же время он имеется в зрелых яйцах. Видимо, гликоген накапливается еще на ранних фазах развития во время прохождения яиц по нисходящим петлям матки, т.е. до окончания процесса дублирования. Р.Мадхави и К.Рао (Madhavi, Rao, 1971) установили, что скорлупа яиц *Oschersium heterovittellatum* мягкая, недубильная, образована эластином. Следовательно, в настоящее время у трематод известно три типа скорлупы яйца: склеротиновая, кератиновая и эластичная. А.П.Ошмарин (1977) кроме известных двух типов разви-



тия начальных стадий гельминтов вводит третий тип - пролярвальный. У трематод с пролярвальным типом развития скорлупа яйца по мнению автора не подвержена дублированию. Основная функция ее заключается только в защите мирацидия во время пребывания его в организме материнской особи и во время миграции во внешнюю среду. Литературные данные по структуре скорлупы яиц трематод с данным типом развития крайне противоречивы. Так, у *P. rhionice* и *Gorgoderina attenuata* скорлупа яиц мягкая, эластичная (Гинецинская, Лукшина, 1979; Nollen, 1971), а у *S. mansoni* она твердая, склеротиновая (Seed, Bennett, 1978; Seed, Kilts, Bennett, 1980).

Анализ литературных и собственных данных не выявил строгой зависимости структуры желточных клеток от систематического положения изученных видов трематод. Структурные и функциональные особенности желточных клеток трематод определяются, главным образом, типами их жизненных циклов.

В настоящее время предпринимаются попытки направленного воздействия на процесс формирования яиц трематод с целью профилактики трематодозов (Dedin, Brugoo, 1964; Erasmus, 1975; 1980; Popiel, Erasmus, 1981; Начева, Гребенщиков, 1982; Богоявленский с соавтор., 1984).

Для обсуждения вопроса о возможностях практического использования полученных данных мы выбрали два вида трематод, имеющих наибольшее практическое значение - *D. lanceatum* и *L. scotiae*. В желточных клетках и скорлупе молодых яиц *D. lanceatum* содержатся сульфгидрильные и аминокислотные группы белков, а также полифенолоксидаза, т.е. все предшественники склеротина. Следовательно, при подборе антгельминтиков необходимо приме-

нять те препараты, которые: а) блокируют сульфгидрильные группы белков, нарушая тем самым биохимические процессы, происходящие с их участием; б) ингибируют полифенолоксидазу, вследствие чего нарушается механизм образования скорлупы яйца дикроцелия. У *L. scotiae* скорлупа яиц кератиновая. В желточниках и в оболочке яиц содержатся дисульфидные группы, которые играют важную роль в поддержании структуры кератина (Торчинский, 1971). Химический разрыв дисульфидных связей приводит к разрушению третичной структуры этого белка, в результате чего кератин размягчается, набухает и теряет свою упругость (Бар, 1969). Следовательно, при подборе антгельминтиков необходимо использовать препараты, которые блокируют дисульфидные группы, нарушая тем самым межмолекулярные пептидные связи. Возможно также расщепление - связей при реакции с соединениями мышьяка, вторичными аминами, триалкилфосфилами (Parker, Kharasch, 1959; цит. по Торчинскому, 1971).

## ВЫВОДЫ

I. Желточные фолликулы мариит изученных шести видов трематод (*Dicrocoelium lanceatum*, *Pneumococcus sibiricus sibiricus*, *Gorgoderia amplicava*, *Diplostomum spathaceum*, *Litorchis scotiae*, *Opisthoglyphe ranae*) состоят из трех типов клеток: стволовых (недифференцированных), развивающихся и зрелых.

Стволовые клетки характеризуются крупным ядром и небольшим объемом цитоплазмы, содержащей большое количество свободных рибосом. Функция их заключается в поддержании репродуктивного потенциала желточников.

Развивающиеся клетки характеризуются хорошо развитым гранулярным или гладким эндоплазматическим ретикулулом и небольшим количеством скорлуповых гранул.

Зрелые клетки содержат скорлуповые глобулы протеиновой природы, которые формируются в цистернах гранулярного эндоплазматического ретикулула. Они являются поставщиками материала для скорлупы яиц и питательных веществ для развивающихся личинок.

2. Структура и функции желточных клеток не зависят от систематического положения и локализации мерит трематод в хозяине и определяются в основном их биологией развития.

В желточных клетках трематод с либеролярвальным типом развития (*L.scotiae*, *O.ganae*, *D.spathaceum*) выявлены гликоген, рибосомальные комплексы и дисульфидные группы белков, амино- и сульфгидрильных групп белков мало, полифенолоксидаза отсутствует.

В желточных клетках трематод с инклюзиолярвальным типом развития (*D.lanceatum*, *P.s.sibiricus*, *G.amolicava*) гликоген не выявлен, преобладают амино-, сульфгидрильные группы белков и полифенолоксидаза.

3. Содержание липидов в желточных клетках не зависит от типа развития трематод. Они выявлены у видов с либеролярвальным (*O.ganae*, *D.spathaceum*) и с инклюзиолярвальным (*D.lanceatum*, *P.s.sibiricus*) типами развития. Липиды желточных клеток являются либо экскреторными, либо вместе с белками входят в состав скорлупы яиц.

4. Скорлупа яиц трематод с инклюзиолярвальным типом развития содержит склеротин, образующийся в процессе дубления

его предшественников с участием фермента полифенолоксидазы, синтезируемых желточными клетками. Скорлупа яиц трематод с либеролярвальным типом развития кератиновая, дубление протеинов в данном случае осуществляется с участием дисульфидных групп протеинов, содержащихся в желточных клетках.

5. Данные по гистохимии желточных клеток трематод могут быть использованы в целях химиопрофилактики трематодозов путем подбора антгельминтиков, блокирующих процесс формирования скорлупы яиц.

### С П И С О К

работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Шаймарданов Ж.К. Гистохимия желточных клеток *Dicrocoelium lanceatum*. 1984. Деп. ВИНТИ, № 6218-84, 7 с.
2. Шаймарданов Ж.К., Федосеенко В.М., Панин В.Я. Ультраструктура желточных клеток *Dicrocoelium lanceatum*. Известия АН КазССР, сер. биол., 1985, № I, с.41-46.
3. Шаймарданов Ж.К., Панин В.Я., Федосеенко В.М. Ультраструктура желточных клеток *Diplostomum paracaudum* (Iles, 1959), Schigin, 1977, *Opisthoglyphe ranae* (Froelich, 1791), *Dolichosaccus rastellus* (Olsson, 1876). Известия АН КазССР, сер. биол., 1985, № 4, с.42-48.
4. Шаймарданов Ж.К., Гулинска Д. Ультраструктура желточных клеток *Gorgoderia amplicava* и *Pneumonoeces sibiricus sibiricus*. Вестник АН КазССР, 1985, № 8, с.76-79.
5. Шаймарданов Ж.К. Гистохимия желточных клеток *Liorchis scotiae* и *Pneumonoeces sibiricus sibiricus*. 1985. Деп. ВИНТИ, № 6378-85, 12 с.