

*Канат Комбарович АХМЕТОВ —
директор Института естествознания
ПГУ им. С. Торайгырова (г. Павлодар),
кандидат биологических наук;
Денис Васильевич ПОНОМАРЕВ —
преподаватель кафедры биологии
Института естествознания ПГУ
им. С. Торайгырова (г. Павлодар)*

УДК 576.895.122

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ТРЕМАТОДЫ *CODONOCEPHALUS URNIGERUS* (RUDOLPHI, 1819) СЕМ. STRIGEIDAE

АННОТАЦИЯ. Описаны особенности организации тегумента, мускулатуры и желточников трематоды *Codonoccephalus urnigerus*. Установлено наличие и распределение основных гистохимических веществ и некоторых ферментов.

*Particularities of tegument, musculatures and vitellines organization of trematode *Codonoccephalus urnigerus* are described. The distribution of main histochemical materials and some enzymes is revealed.*

Класс Trematoda насчитывает около 4000 видов. По своему строению половозрелые особи этого класса достаточно разнообразны. Однако на данный момент исследованиями по функциональной морфологии охвачено лишь незначительное количество видов, что не позволяет дать комплексную оценку всего многообразия морфофункциональных адаптаций данной группы гельминтов.

Трематоды, представители семейства Strigeidae являются интересным объектом для изучения в связи с наличием вторичнодифференцированного тела, которое поделено на два сегмента, отличающихся по строению и выполняемым функциям.

Данная работа посвящена изучению функциональной морфологии кожно-мускульного мешка и желточников трематоды *Codonoccephalus urnigerus*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Половозрелых особей *Codonoccephalus urnigerus* извлекли из кишечника выпей. Для гистологического и гистохимического анализа были использованы следующие фиксаторы: 10% нейтральный формалин, 800 и 900 этиловый спирт, 800 и абсолютный ацетон, фиксаторы Бейкера, Карнуа, Россмана, Ценкера. Гельминтов фиксировали при 4°C в течение 16-24 часов. Затем обезвоживали в спиртах восходящей концентрации (50, 60, 70, 80, 90, 96 и 100) и проводили через смесь бензола и 100% спирта в соотношениях 1:2, 2:1 и чистый бензол. Далее материал пропитывали парафином в термостате при температуре 54°-56°C (в трех сменах) и окончательно заливали в парафин. Для микроморфологических исследований срезы толщиной 4-7 мкм окрашивали гематоксилин-эозином по Карацци, гематоксилин-эозином по Эрлиху и по методике Маллори. В исследовании использовано 12 гистохимических и 16 вспомогательных тестов.

Суммарные протеины выявлены методом Бонхега, основные белки прочным зеленым при pH 8.0, кислые белки прочным зеленым при pH 2.2. SH-группы протеинов

по методике Шевремона и Фредерика, NH₂-группы по Ясума и Итчикава, SS-группы надмуравьиной кислотой с последующей обработкой альциановым синим. Гликоген определяли по Мак-Манусу, кислые мукополисахариды по Сидмену. Кислую и щелочную фосфатазы по Гомори. Наличие фермента — полифенолоксидазы определяли методом Смита. Для оценки результатов исследований были проведены химические контроли, метилирование, деметелирование, денатурация ферментов.

Полученные препараты изучались при помощи микроскопов «Polivar» (Австрия), «Biolar» (PZO Польша).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Микроморфология тегумента. Тело отчетливо двухсегментное. Передний сегмент воронковидный с широким открытым отверстием. Вентральная впадина неглубокая. Края сегмента иссечены на небольшие доли. Маленькая ротовая присоска занимает субтерминальное положение. Латеральные присоски отсутствуют. Брюшная присоска значительно крупнее ротовой и фаринкса. Нижнюю половину переднего сегмента занимают протеолитические железы. Задний сегмент цилиндрический, булавовидный, более широкий в области расположения гонад и суживающийся к концам, с гибкой «шейной» частью. Задний конец тела резко сужен и тупо срезан перпендикулярно продольной оси тела. Область полового атриума отделена слабо выраженным сужением. Передний сегмент имеет широкую воронковидную форму. Тегумент этого отдела ровный, слои его по сравнению с другими участками тела развиты слабо.

Наружный цитоплазматический слой гомогенный, при исследовании световым микроскопом под увеличением 600 раз в нем не отмечается присутствие каких-либо дифференцируемых структур. Толщина этого слоя 1-1,56 мкм. Базальная пластинка на светооптическом уровне еле заметна, субтегументальные клетки примыкают к слоям мышечных структур и имеют размеры 3,1-4,7 x 2-2,8 мкм. Толщина тегумента около 25-30 мкм. Таким образом, передний сегмент — это достаточно тонкостенное образование.

Тегумент полового атриума выровненный, не имеет шипиков и папилловидных образований, наружная поверхность содержит едва заметную на светооптическом уровне ворсинчатость. Толщина синцитиальной пластинки 1,5-3,12 мкм. Покровы переднего сегмента отличаются от заднего тем, что имеют складки, в которых установлено присутствие везикул, подобные структуры содержатся в субтегументальных клетках, расположенных в подтегументальном пространстве. Толщина цитоплазматической пластинки на уровне папилловидных выростов 6,24-9,36 мкм. В них отмечено большое количество гранулярных структур.

Субтегументальные клетки в переднем сегменте имеют грушевидную форму, цитоплазма содержит гранулярные элементы. Ядра содержат 2-3 глыбки хроматина. Размер клеток составляет 4,7-7,8 x 3,1-4,5 мкм, ядра 1,5 мкм в диаметре. Субтегументальные клетки имеют плотные тесные связи с паренхимой.

Базальная пластинка неровная, в связи с этим и высота синцитиального слоя может варьировать в сторону увеличения или уменьшения.

Тегумент заднего сегмента образует крупные складки. Папилловидных структур нет. Цитоплазматический слой тегумента имеет высоту около 1-1,5 мкм. Апикальная мембрана под увеличением в 600 раз выглядит волнообразной. Базальная пластинка повторяет изгибы покровов и выглядит довольно развитой, она имеет тесные связи с плотно прилегающими к ней кольцевыми мышцами, которые, в свою очередь, соединены с ниже лежащими мышечными волокнами.

Цитоны расположены плотным слоем в подтегументальной области, клетки имеют грушевидную форму, иногда образуют большие скопления фолликул 10-15 кле-

ток. Цитоплазма заполнена гранулярными структурами. Размеры цитонов 9-19х3-3,8 мкм.

Мускулатура тела. Мускулатура тела в различных участках тела развита дифференцировано. Мускулатура переднего сегмента развита слабо. Под базальной пластинкой тегумента располагаются слои продольной мускулатуры, диаметр этих волокон менее 1 мкм. Кольцевые мышцы, по-видимому, отсутствуют или их очень мало. На препаратах можно наблюдать лишь прерывистые кольцевые волокна, которые могут иметь и диагональную направленность.

Мускулатура заднего сегмента тела *S. urnigegus* развита. И, похоже, что основные сократительные, двигательные функции выполняют мышечные волокна этого отдела тела.

На границе переднего и заднего сегмента под базальной пластинкой тегумента располагаются продольные мышечные волокна, которые, направляясь к переднему сегменту, принимают диагональное расположение, хотя часть волокон сохраняет продольное направление. С этими волокнами имеют тесные связи кольцевые волокна, которые на поперечных срезах имеют овальную форму. Размеры их 3-4,8х1-1,5 мкм.

В основной части заднего сегмента кольцевые мышцы в диаметре около 1,2 мкм, они довольно плотно располагаются сразу под базальной мембраной. Расстояние между соседними волокнами не более одного диаметра.

Продольные мышечные волокна в заднем сегменте находятся от базальной пластинки на расстоянии 78-65 мкм и выглядят очень развитыми, эти волокна «объединены» в группы, по-видимому, они обеспечивают сократительные движения гельминта. Следует отметить, что эти волокна расположены глубоко в слоях паренхимы и соседствуют с петлями матки и кишечным стволом.

В частях тела, где расположены половые гонады и матка, продольные мышечные волокна поднимаются ближе к покровам и у полового атриума снова формируют мощные пучки.

Мышцы полового атриума связаны в основании с продольными пучками через большое количество паренхимных мышц, имеющих каудально-краниальное направление. Собственно мышцы полового атриума состоят из довольно слабо развитых кольцевых и диагональных волокон. Их диаметр 1-1,56 мкм.

Желточники. Многочисленные фолликулярные желточники занимают значительный объем тела червя, располагаясь в обоих сегментах. Основная часть желточников находится в передней части заднего сегмента, доходит до уровня переднего семенника. Ниже границы заднего семенника располагаются лишь единичные фолликулы.

Стенки фолликул образованы отростками паренхимных клеток, толщина которых достигает 5,75 мкм. Желточные клетки различаются по степени зрелости. Незрелые располагаются у стенок фолликула, обладают базофильной цитоплазмой, из-за чего ядро плохо контурируется. По мере созревания базофилия цитоплазмы значительно уменьшается, у зрелых сохраняется только у клеточных границ. Количество скорлуповых глобул увеличивается, ядро и ядрышко хорошо просматриваются.

Гистохимия покровов. При проведении гистохимических тестов на присутствие суммарных белков установлено, что апикальная мембрана тегумента реагирует умеренно, а собственно цитоплазматический слой тегумента, цитоплазма субтегументальных клеток, базальная пластинка тегумента дают слабую реакцию. Белковая природа реагирующих субстанций подтверждена постановкой контрольной реакции. Близлежащая к тегументу паренхима также дает слабую реакцию на суммарные белки.

Апикальная мембрана слабо реагирует в тестах на основные протеины. Цитоплазматический слой тегумента краситель прочный зеленый при рН 8.0 воспринимает

умеренно, что говорит о присутствии основных белков в синцитиальном слое тегумента. Цитоплазма субтегументальных клеток, паренхима и базальная пластинка слабо положительны на основные белки.

Наиболее интенсивная реакция на содержание основных протеинов установлена в клетках мышечных волокон.

Кислые протеины отсутствуют в апикальной мембране покровов, а наиболее сильную реакцию дают в цитоплазматической пластинке тегумента и цитоплазме субтегументальных клеток, базальная мембрана показывает умеренное окрашивание.

Реакция Ясума и Итчикава на аминокислоты белков выявила их отсутствие в апикальной мембране тегумента, а в цитоплазматическом слое имеются гранулы, окрашивающиеся на NH_2 группы, такие же гранулы установлены в цитоплазме субтегументальных клеток. Базальная пластинка и мышечные волокна отрицательны на содержание аминокислот.

Слабоположительная реакция на присутствие $-\text{SH}$ групп протеинов по методу Шевремона и Фредерика проявляется лишь в цитоплазматическом слое тегумента. Реакция с надмуравьиной кислотой и альциановым синим на присутствие свободных ($-\text{SS}$) групп белков показала незначительное их содержание в апикальной мембране, синцитии тегумента и в цитоплазме субтегументальных клеток. Базальная мембрана, паренхима и мышечные волокна отрицательны на содержание дисульфидных групп протеинов.

Апикальная мембрана и цитоплазматический слой тегумента активно окрашиваются методом ШИК по Мак-Манусу, что указывает на присутствие гликогена и нейтральных мукополисахаридов. А цитоплазма субтегументальных клеток дает в этом случае умеренное или слабое окрашивание. Базальная пластинка показывает умеренную реакцию. Кислые мукополисахариды при помощи реакции Сиддмена установлены только на поверхности апикальной мембраны.

Реакция на фосфолипиды слабо положительна лишь в апикальной и базальной мембранах тегумента. Остальные компоненты покровов данной трематоды отрицательны на тест Клувера и Барейры. Реакция Фельгена на присутствие нуклеиновых кислот показала, что синцитиальный слой тегумента и цитоплазма цитонов тегумента содержат гранулы, окрашивающиеся в малиновый цвет, что говорит о присутствии этих веществ. Остальные компоненты тегумента отрицательны на содержание нуклеиновых кислот.

Реакция Гомори на присутствие в слоях тегумента кислой фосфатазы выявила, что этот фермент содержится лишь в цитоплазматической пластинке. Тест Гомори на щелочную фосфатазу дает умеренную реакцию в апикальной мембране и цитоплазматическом слое, а цитоплазма цитонов при этом показывает слабую реакцию.

Гистохимия желточников. Желточники *Codonocephalus urnigerus* характеризуются одинаковой интенсивностью окраски прочным зеленым при различных значениях pH, что позволяет утверждать о преобладании белков основной природы в их составе, что также подтверждается тестом по методу Бонхега с бромфеноловым синим.

Сульфгидрильные группы белков обнаружены в желточниках в большом количестве. Свободные аминокислоты протеинов также являются составным компонентом желточников. Тирозин в срезах регистрируется только в желточниках и приурочен к скорлуповым глобулам.

В углеводном составе желточных клеток доминирует гликоген, распределенный в виде гранул в цитоплазме у клеточной стенки. Нейтральные мукополисахариды также входят в состав желточных клеток. Это подтверждается ШИК реакцией по Мак Манусу с соответствующими контролями. Тест на наличие фермента полифенолоксидазы дал положительные результаты в скорлуповых глобулах, цитоплазме желточных клеток и в скорлупе молодых яиц.

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам изучения строения кожно-мышечного мешка трематоды *C. urnigerus* установлено, что она имеет общепринятую структуру, которая характерна для всех представителей класса трематод. В состав тегумента входит синцитиальный слой и цитона. Связь цитонов и синцития тегумента в процессе онтогенеза не раз может прерываться и восстанавливаться, подобное ранее отмечалось в работах Чубрик [1].

Тегумент исследованной трематоды образует складки, в которые включаются все слои кожно-мышечного мешка. Формирование этих структур, по-видимому, связано с увеличением толщины синцитиального слоя. Такая функциональная реакция способствует противостоянию агрессивной среде кишечника хозяина. Gibson, Bray [2] образование складок связывают именно с этим.

Химическая структура синцитиального слоя обнаруживает приспособления к среде в виде наличия ферментов, способствующих адсорбции через тегумент. Косвенным доказательством его присутствия является обнаружение в составе гранулярного материала SH-групп. По утверждению Ansinsen [3] сульфгидрильные группы — это бесспорные показатели присутствия активных ферментов. Подобные SH-группы белков характерны и для гранул в составе цитонов. Помимо вышеупомянутых групп нами установлены и NH₂ группы белков. Они также характерны для гранул. Мы, соглашаясь с Малер, Кордес [4], считаем, что активные аминокислотные группы указывают на наличие энзимов.

Трематода *C. urnigerus*, являясь представителем сем. Strigeidae, имеет особый, отличный от представителей других семейств мышечный аппарат. Главной отличительной особенностью является наличие развитых продольных волокон во втором сегменте тела. Такое расположение мышечных элементов указывает на то, что этот сегмент может быть сокращен в момент прохождения пищевых масс в районе локализации гельминта.

Вышеописанное строение, возможно, объясняется «вторичной дифференцированностью» стригейдид. Ohman [5] ставит вопрос о проблематичности наличия у стригейдных трематод диагональных мышц, и это действительно подтверждено нашими исследователями и данными Ястребова [6].

Строение переднего сегмента трематоды говорит о том, что в акте присасывания участвует весь передний сегмент и ротовая присоска. А участие ложноприсосок в фиксации, возможно, не так велико, так как их мышцы развиты весьма слабо.

Преобладание гликогена в желточниках и сформированных яйцах, относительно короткая матка и очень объемные желточники указывают на то, что развитие яиц *Codonoccephalus urnigerus* происходит во внешней среде, что соответствует либеролярвальному типу развития мирацидия по определению Ошмарина [7].

Доминирование основных белков в составе желточников, наличие — NH₂ и — SH групп протеинов, а также присутствие фермента полифенолоксидазы указывает на хинон-склеротиновый тип дублирования скорлупы яиц у трематоды *Codonoccephalus urnigerus*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чубрик Т. К. Морфофункциональные приспособления у гермафродитного поколения трематод к паразитическому образу жизни в окончательных хозяевах // Паразитология. 1982. Т. 16, № 1. С. 53-61.
2. Gibson D. Y., Bray R. A. The Hemiuroidea: terminology, systematics, and evolution // Bull. British Mus. (Natur. Hist). 1979. № 36. P. 35-146.
3. Ansinsen C. B. Principles that govern the folding of protein chains. 1973. 181 p.

4. Малер Г., Кордес Ю. Основы биологической химии. М., 1970. 567 с.
5. Ohman C. The structure and function of the adhesive organ in strigeid trematodes. III *Apatemon gracilis minor* (Yamaguti, 1933) // *Parasitol.* 1966. Vol. 56, № 2. P. 209-226.
6. Ястребов М. Б. Мускулатура тела некоторых трематод и фиксация фаз в эволюции присасывательной функции // *Зоол. журн.* 1997. Т.76, № 6. С. 645-656.
7. Ошмарин А. П. К изучению закономерностей начальных стадий развития гельминтов // *Экология гельминтов.* Ярославль, 1977. Вып. 1. С. 53-61.

*Галина Александровна ПЕТУХОВА —
доцент кафедры экологии и генетики,
кандидат биологических наук;
Мамлакат Сабировна ИШБУЛАЕВА;
Нелли Петровна СЕМЕРИКОВА;
Светлана Вячеславовна ТРУБИНА —
студенты биологического
факультета ТюмГУ*

УДК 681.3.574.3.575.224

ГЕНОТОКСИЧНОСТЬ ШАИМСКОЙ НЕФТИ И ЕЕ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФРАКЦИИ В ТЕСТАХ НА ДРОЗОФИЛЕ

АННОТАЦИЯ. В работе приведены результаты изучения генетической опасности нефти и ее водорастворимой фракции в экспериментах на дрозофиле. Показана высокая токсичность и генетическая опасность нефти и ее водорастворимой фракции для мух.

The article discovers a genetic danger of oil and its water-soluble factions in experiments on drosophila. High toxicity and genetic danger of oil and its water-soluble factions for flies are shown there.

Интенсивная разработка нефтяных и газовых месторождений в Тюменской области остро ставит проблему охраны богатой северной природы. Наиболее тяжелыми и опасными по своим последствиям являются загрязнения подземных и наземных пресных вод и почвы. К основным загрязнителям в глобальном масштабе относятся нефть, буровой и нефтяной шламы и сточные воды нефтеперерабатывающих производств [1]. Катастрофические нефтяные загрязнения, особенно если они продолжительны, вызывают сукцессию прибрежных и придонных сообществ с локальной и региональной аккумуляцией нефтепродуктов. При этом различные загрязнения действуют в комплексе и возможно изменение генотипа представителей биоты, а также общее ухудшение качества воды [2]. Известно, что нефть — многокомпонентная система, состав которой очень гетерогенен [3]. Наиболее опасными для организмов компонентами нефти являются ее растворимые и эмульгированные фракции, так как, попадая в организм гидробионтов, они могут проходить через многих представителей пищевой цепи, не претерпевая существенных изменений в силу своей химической инертности. О высокой токсичности сырой нефти и составляющих ее компонентов известно из литературы [4-7]. Мутагенная и тератогенная активность нефти и ее водорастворимой фракции изучена недостаточно. В связи с этим и было предпринято данное исследование.