

УДК 576.895.122 : 591.16

**ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕРМИНАЛЬНОГО МАТЕРИАЛА
И ДИНАМИКА РАЗМНОЖЕНИЯ МАТЕРИНСКИХ СПОРОЦИСТ
РОДА ECHINOSTOMA (ТРЕМАТОДА: ECHINOSTOMATIDAE)**

© Г. Л. Атаев, А. И. Аванесян, С. Локер, А. А. Добровольский

Изучение организации герминального материала и динамики размножения материнских спороцист трематод имеет принципиально важное значение для правильной оценки природы этих организмов (Добровольский и др., 2000), без чего в свою очередь невозможен корректный анализ путей становления рассматриваемого таксона. Проведенное исследование показало, что герминальный материал мирацидиев эхиностоматид (род *Echinostoma*) представляет собой типичную герминальную массу. Последняя содержит полностью сформированные генеративные клетки, несколько клеток, находящихся на разных стадиях «физиологического» созревания, и 2—3 недифференцированные клетки. Для мирацидиев изученных представителей рода *Echinostoma* характерна небольшая вариабельность в степени развития герминального материала, проявляющаяся как на межвидовом, так и на внутривидовом уровнях. Так, у мирацидиев *E. paraensei* в состав герминального материала могут входить не только генеративные клетки, находящиеся на разных стадиях «созревания», но и приступивший к дроблению зародыш. У *E. caproni* ничего подобного наблюдать не удается. Эти небольшие различия в организации герминального материала мирацидиев заметно сказываются на динамике размножения паразитической фазы развития материнской спороцисты. Обсуждается возможность возникновения педогенеза в эволюции материнских спороцист.

Интерес к жизненным циклам трематод неуклонно возрастает. Причин тому несколько. Главная из них — осознание паразитологами того факта, что эволюция трематод это прежде всего эволюция их жизненных циклов как в целом, так и составляющих их фаз и поколений. К сожалению, последние изучены не одинаково детально. Отсутствие полноценных данных по морфологии, биологии и особенностям размножения спороцист и редий неизбежно отражается на наших трактовках природы партенит и соответственно на всем комплексе представлений о происхождении и филогении трематод.

Наименее изученным поколением жизненного цикла сосальщиков остаются материнские спороцисты (МС), в онтогенезе которых свободноживущая расселительная фаза — мирацидий сменяется паразитической фазой, обитающей в моллюске. Это обусловлено рядом объективных и субъективных причин. К первым относятся мелкие размеры и короткие сроки жизни мирацидиев, труднодоступность паразитической фазы, большое количество методических сложностей, связанных с экспериментальной постановкой жизненного цикла, и т. д. Вторые определяются отношением к мирацидию как к малозначимой личинке, изучение которой не может дать ничего существенного для познания трематод.

Все это привело к тому, что подавляющее большинство имеющихся в литературе описаний мирацидиев и сопровождающих их иллюстраций, как правило, характеризуется схематизмом и фрагментарностью. Особенно неполноценна информация о генеративных элементах мирацидия и их последующей судьбе на паразитической фазе

развития в моллюске. А ведь детальное знание динамики размножения МС — первого, филогенетически самого древнего поколения — важнейший ключ к пониманию истинной природы жизненного цикла трематод, без чего, в свою очередь, невозможно реконструировать ранние этапы становления этой группы (Добровольский и др., 2000). Особая роль в исследованиях такого рода принадлежит представителям наиболее архаичных семейств, к числу которых, без сомнения, относится и сем. Echinostomatidae.

Сравнительный анализ развития герминального материала МС двух видов рода *Echinostoma* — главная задача настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом настоящего исследования послужили два вида рода *Echinostoma* — *E. caproni* и *E. paraensei*. Близкое родство этих видов не вызывает сомнений, однако приводимые ниже результаты свидетельствуют в пользу их самостоятельности. Это же подтверждают и результаты последних исследований, в том числе и молекулярно-биологических (Morgan, Blair, 1995, 1998; Kostadinova, Gibson, 2000).

Источником материала послужили культуры *E. caproni* и животных-хозяев, поддерживаемые в лаборатории биологии животных Перпеньянского университета (Франция). Культура *E. paraensei* любезно предоставлена лабораторией отдела биологии университета Нью-Мехико (США). Мирацидии обоих видов были получены из зрелых яиц, источником которых служили экспериментально зараженные лабораторные мыши. Часть личинок была использована для заражения моллюсков-хозяев, часть же зафиксирована для гистологических и электронно-микроскопических исследований.

Для получения паразитической фазы развития МС *E. caproni* мирацидиями этого вида были заражены моллюски *Biomphalaria glabrata* и *B. pfeifferi*. Заражению подвергались моллюски 2-месячного возраста. Средняя доза заражения составила 9 мирацидиев на одного моллюска. Инвазированных моллюсков содержали в аквариумах при 26°. Корм состоял из высушенных кленовых листьев, резаной моркови и элодеи. Световой режим — 12 : 12 ч. Вскрытия моллюсков проводились каждые 3 ч в течение первых суток, затем ежесуточно на протяжении первых 7 дней, а в последующем через каждые 2 сут вплоть до 21-го дня с момента заражения.

Для гистологического исследования мирацидии были зафиксированы жидкостью Буена. В дальнейшем использовали модифицированную методику заливки в желатин-парафин (Langeron, 1949). Были изготовлены полные серии срезов 3—4 мкм толщины. Для окраски использовали гематоксилины Эрлиха и Майера с последующей подкраской водным раствором эозина.

Для просветной электронной микроскопии мирацидиев после тщательной промывки в растворе Чернина фиксировали при 4° в глутаральдегиде и OsO₄, разведенных на фосфатном буфере (рН 7.4). Осмолярность 425 mOsm. Заливку осуществляли в Эпон 812 по модифицированной методике А. Фурнье (A. Fournier; лич. сообщ.). Тонкие срезы были изготовлены на ультрамикротоме LKB-3. Для контрастирования срезов использовали уранилацетат и цитрат свинца. Изучение полученных материалов проводили на микроскопе Hitachi HU 12 при ускоряющем напряжении 75 кВ.

Кроме того, из тех же блоков были изготовлены полутонкие срезы (1—2 мкм толщиной), окрашенные метиленовым синим, толлуидиновым синим, по Маллори и азур-фуксином.

Для гистологического исследования партенит, в первую очередь МС, экспериментально зараженных моллюсков фиксировали жидкостью Буена или Халми и заливали в парафин по общепринятой методике. Серии срезов 4—5 мкм толщины окрашивали гематоксилинами Майера, Бемера и Эрлиха с подкраской эозином.

Для светооптических исследований были использованы микроскопы Jenoval, Loboval и Биомед. Измерения объектов проводили традиционным способом с исполь-

зованием объективов $\times 25$, $\times 40$ и $\times 60$. Из-за неправильной формы клеток и ядер определение их площади на срезах осуществляли с помощью окулярной сетки с известной длиной стороны квадрата: подсчитывали количество квадратов, полностью или частично перекрываемых измеряемой структурой. Фотоработы были выполнены на оптических системах Polyvar и Nikon.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мирацидии *E. caproni*. Зрелые, покинувшие яйцевые скорлупки мирацидии имеют типичное для представителей этого семейства строение (рис. 1, А). В состав их тела (120—128 мкм длины, 35—36 мкм ширины) в среднем входит 46.5 ± 0.6 клетки ($n = 40$; подсчет проводился по числу ядер на окрашенных препаратах). На своей поверхности мирацидий несет 4 поперечных ряда эпителиальных пластинок. В передней трети тела залегают ганглии, сближенные в медиальной плоскости глаза и 4-ядерная железа проникновения. На хоботке и по границе первого и второго рядов эпителиальных пластинок располагаются разнообразные сенсиллы. За ганглием слегка асимметрично залегают пара циртоцитов, от которых по направлению к заднему концу тела отходят капилляры. Экскреторные поры расположены латерально на границе 3-го и 4-го рядов эпителиальных пластинок. Детальное описание соматических структур изученных мирацидиев не входило в задачу настоящего исследования. Главное внимание было уделено анализу состояния герминального материала.

При изучении мирацидиев на светооптическом уровне (прижизненные наблюдения на временных препаратах, полутонкие срезы, окрашенные метиленовым синим или толлуидиновым синим) хорошо заметно, что практически вся задняя половина их тела занята группой плотно упакованных клеток, которые по своему внешнему виду заметно отличаются от остальных. Для них в целом характерны относительно крупные размеры, наличие большого пузырьковидного ядра с хорошо заметным ядрышком, сильная деспирализация хроматина. Правда, последний признак, так же как и размеры клеток, варьирует в довольно широких пределах. Объем гомогенной цитоплазмы на первый взгляд относительно велик. Из-за упоминавшейся выше плотной упаковки клетки часто приобретают неправильную полигональную форму.

Внешне все эти клетки составляют единую группу и очень похожи друг на друга (рис. 1, А; 2, А; см. вкл.). В то же время на сериях срезов при использовании некоторых гистологических красителей (в первую очередь гематоксилинов в сочетании с эозином) отчетливо проявляется разнокачественность рассматриваемых клеток (рис. 1, Б). Прежде всего выделяются крупные секреторные клетки (клетки 1-го типа), количество которых у мирацидиев *E. caproni* составляет в среднем 6.8 ± 0.2 ($n = 27$).¹ Их линейные размеры не превышают 10—12 мкм. Однако неправильная полигональная форма и наличие массивных «выростов» очень затрудняют измерение этих клеток.

Характерный признак секреторных клеток — очень крупные ядра пузырьковидного типа. Площадь среза ядра в экваториальной зоне составляет 23.9 ± 0.6 мкм² ($n = 20$), что превышает аналогичные значения для ядер клеток других типов, составляющих тело личинки. Сами ядра характеризуются очень сильной деспирализацией хроматина. Кариоплазма выглядит оптически пустой. Крупное, ярко окрашивающееся ядрышко, как правило, занимает слегка эксцентричное положение. Цитоплазма этих клеток эозинофильна. В ней присутствуют скопления мелких, преломляющих свет гранул.

Выявляемые при использовании гистологических методов клетки 2-го типа представляют собой типичные генеративные клетки, присущие спороцистам и редиям всех сосальщиков. Их общее количество обычно не превышает 6. Они более полиморфны, чем секреторные. Линейные размеры этих клеток варьируют в пределах 5.4—9 мкм

¹ Здесь и далее $P < 0.05$.

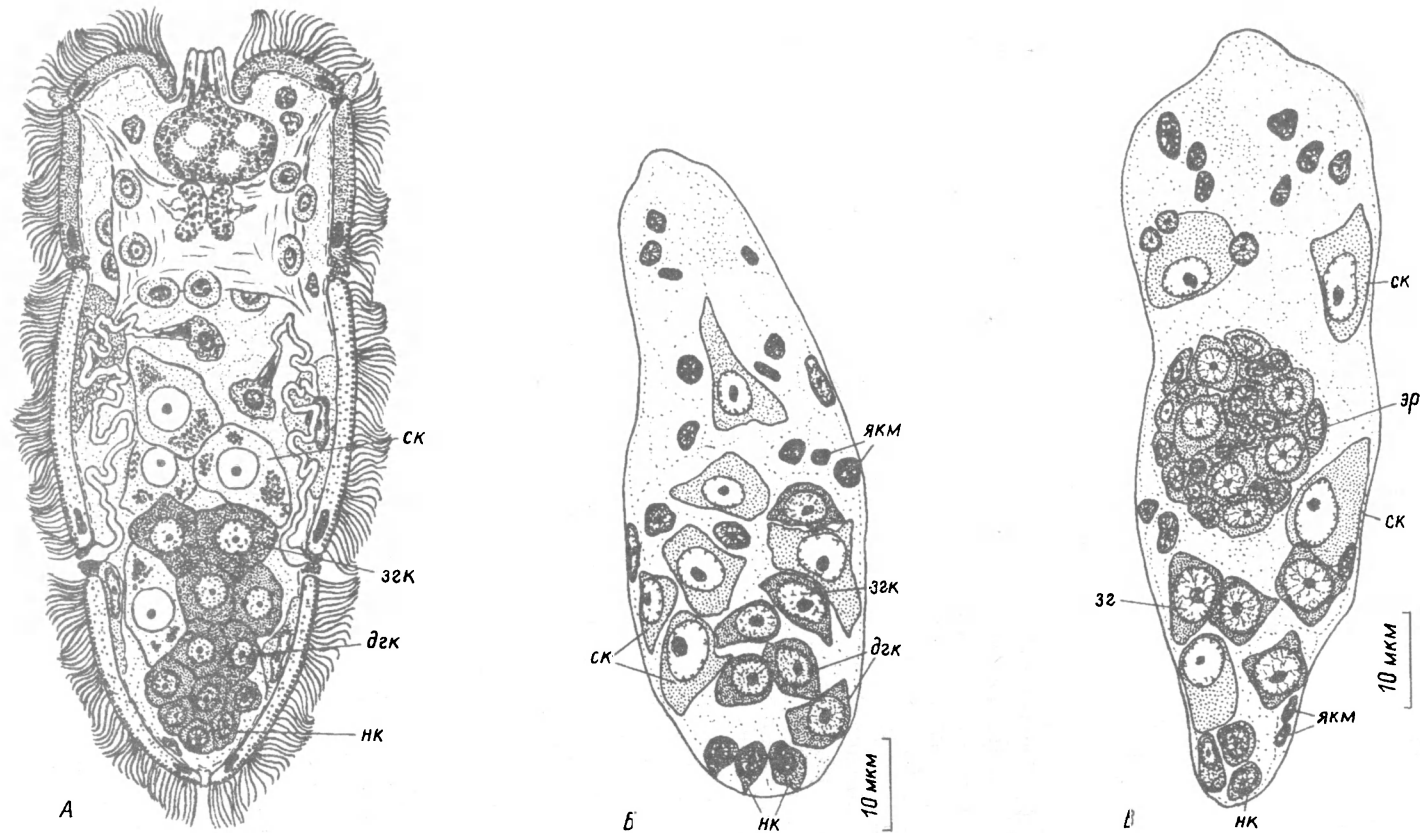


Рис. 1. Строение мирацидиев трематод рода *Echinostoma*.

A — общая схема строения личинки; *B* — продольный срез через тело мирацидия *E. caproni*; *B* — продольный срез через тело мирацидия *E. paraensei*; згк — зрелые генеративные клетки; дгк — генеративные клетки, находящиеся на разных этапах дифференцировки; нк — недифференцированные клетки; ск — секреторные клетки; якм — соматические клетки мирацидия; эр — эмбрион реди; *A* — реконструкция по результатам прижизненных наблюдений и изучения полутонких и парафиновых срезов; *B*, *B* — рисунки с парафиновых срезов; масштаб — 10 мкм.

Fig. 1. Structure of micracidia of trematodes of the genus *Echinostoma*.

(\bar{x} 6.87 ± 0.17 ; $n = 30$); среднее значение площади среза составляет 27 ± 0.8 мкм², $n = 19$. Самые крупные клетки этой группы (как правило, их всего 2) чаще всего занимают переднее положение и располагаются либо непосредственно за, либо между секреторными клетками. Линейные размеры этих клеток колеблются в пределах 8.1—9 мкм; площадь среза в экваториальной части достигает 36 мкм². Клетки полигональной формы, но более компактные, чем секреторные, и не образуют крупных выростов. Базофильная, интенсивно окрашивающаяся цитоплазма окружает ядро в виде неравномерной по толщине каймы.

Ядра пузырьковидные с центрально расположенным крупным ядрышком. Количество гетерохроматина в них значительно больше, чем в ядрах секреторных клеток. Именно поэтому они не выглядят оптически пустыми. Хроматин довольно равномерно распределен по кариоплазме и представлен небольшими гранулами и нитевидными структурами. По всем признакам это «зрелые», готовые к дроблению генеративные клетки.

Непосредственно за «зрелыми» располагаются 2—3 клетки, линейные размеры которых в среднем составляют 7.2 мкм. Соответственно мельче и их ядра с крупным центрально расположенным ядрышком. Ядра характеризуются наличием большого количества гетерохроматина и его более плотной упаковкой, чем у «зрелых» клеток. Тем не менее они без всяких оговорок относятся к ядрам пузырьковидного типа.

Заметно более мелкие генеративные клетки (линейные размеры 5.4—6.3 мкм; средняя площадь среза 23 мкм²) залегают в каудальной части тела личинки. Они сохраняют ядра пузырьковидного типа, однако количество гетерохроматина в последних еще больше. В совокупности все клетки 2-го типа представляют собой генеративные клетки, находящиеся на разных стадиях дифференцировки.

Самое каудальное положение занимают еще 2—3 небольшие клетки. Для них характерна сильная вариабельность размеров: линейные размеры 3.6—7.2 мкм (\bar{x} 5.55 ± 0.18 , $n = 30$). Среднее значение площади среза 17.6 ± 0.5 мкм² ($n = 16$). Чаще всего они образуют компактную группу. Интенсивно окрашивающаяся цитоплазма в виде тонкой каемки окружает плотное ядро с большим количеством гетерохроматина. Особенно плотно гетерохроматин упакован в центральной части ядра и по его периферии. Трактовка природы этих клеток не вызывает особых сомнений — по всем признакам они должны рассматриваться как типичные недифференцированные клетки, входящие в состав герминальных масс партенит большинства видов трематод.

Электронно-микроскопические данные в деталях подтверждают описанную выше картину. Секреторная природа клеток 1-го типа не вызывает сомнений. Крупное, почти правильно округлое ядро содержит эксцентрично расположенную и крайне гетерогенную по своей структуре нуклеолу. Слабозернистая, прозрачная кариоплазма практически лишена гетерохроматина. Лишь на внутренней поверхности ядерной оболочки последний образует очень небольшие скопления (рис. 2, В, Г). В цитоплазме в большом количестве присутствуют каналы эндоплазматического ретикулюма (ЭПР). Чаще наблюдается плотная линейная упаковка, несколько реже встречается концентрическая. Большие участки цитоплазмы заняты скоплениями мелких, неправильно округлых секреторных гранул. Последние гетерогенны по своей структуре, что может отражать разные стадии созревания секрета. Относительно небольшие вытянутые митохондрии агрегированы в компактные группы.

Клетки 2-го типа (генеративные клетки) заметно отличаются от описанных выше (рис. 2, В—Е). Они обладают более ровными контурами. Их цитоплазма гомогенна и не содержит секреторных включений. ЭПР выражен очень слабо. Вытянутые в длину митохондрии так же, как и в клетках 1-го типа, образуют плотные скопления. Последние чаще всего занимают периферическое положение и локализируются под поверхностной мембраной. Неправильной формы ядра этих клеток содержат большое, гетерогенное по своей структуре ядрышко и многочисленные относительно крупные скопления гетерохроматина. Хорошо подтверждается данными электронной микроскопии вариабельность в строении генеративных клеток, отражающая процесс их созревания.

Мирацидии *E. paraensei*. Морфологически личинки *E. paraensei* (рис. 1, В) очень близки к описанным выше мирацидиям *E. caproni*. Правда, общее количество клеток, составляющих тело личинки у рассматриваемого вида, достоверно больше, чем у предыдущего (\bar{x} 67.4 ± 1.5; $n = 20$).

Самые заметные различия проявляются в организации герминального материала и топографически связанных с ним специализированных секреторных клеток.

По расположению и особенностям организации секреторные клетки мирацидиев двух рассматриваемых видов практически идентичны. Однако количество секреторных клеток у мирацидиев *E. paraensei* в среднем составляет 11.3 ± 0.5 ($n = 22$), что несколько больше, чем у личинок *E. caproni*. И сами эти клетки заметно крупнее: среднее значение площади среза их ядер составляет 32.3 ± 1 мкм² ($n = 20$).

Собственно генеративные элементы мирацидиев *E. paraensei* также более многочисленны, чем у личинок *E. caproni*. Общее их количество колеблется от 10 до 14 и в среднем составляет 11.6 ± 0.2 ($n = 20$). Их линейные размеры варьируют в пределах 6.3—9.9 мкм (\bar{x} 8.28 ± 0.17; $n = 30$). Среднее значение площади среза составляет 36.6 ± 1.2 мкм² ($n = 28$).

Зрелые генеративные клетки достигают размеров 9—9.9 мкм. Все измеренные нами клетки промежуточной группы оказались совершенно одинаковыми — 8.1 мкм. Группа мелких, только начавших дифференцировку клеток более гетерогенна по размерам (6.3—7.2 мкм). В самой каудальной части тела личинки так же, как и у мирацидиев *E. caproni*, локализируются 2—3 мелкие недифференцированные клетки. Их размеры также немного превышают размеры аналогичных клеток личинок *E. caproni*: 5.4—8.1 мкм (\bar{x} 6.63 ± 0.13, $n = 30$), среднее значение площади среза 19.6 ± 0.4 мкм² ($n = 30$).

Главное же различие между мирацидиями двух рассматриваемых видов заключается в том, что у *E. paraensei* в состав герминального материала наряду с генеративными клетками, находящимися на разных стадиях дифференцировки, могут входить и эмбрионы. Из 23 детально обследованных мирацидиев зародыши редий были обнаружены нами лишь в трех особях, при этом каждая из них содержала по одному эмбриону. Все они в своем развитии достигли стадии «зародышевого шара», по терминологии Ченга (Cheng, 1961), т. е. на их поверхности уже была сформирована зародышевая мембрана. Сами эмбрионы состояли примерно из 20—25 бластомеров (рис. 1, В; 2, Б).

У мирацидиев, содержащих зародыши, количество генеративных клеток сокращается до 6—8, но зато общее количество клеток, обнаруживаемых в теле личинки, заметно возрастает (до 90).

Паразитическая фаза развития материнской спороцисты *Echinostoma caproni*. Ранее мы уже подробно описали, начиная с момента заражения моллюска, ход событий, связанных со становлением микрогемипопуляции партенит *E. caproni*, и детали морфогенеза паразитической фазы развития МС (Атаев и др., 1997; Атаев, 2000). В настоящем сообщении мы ограничимся анализом преобразований гермильного материала, протекающих в процессе метаморфоза мирацидия, внедрившегося в моллюска, и последующего созревания и функционирования МС.

В течение первых суток после заражения, когда осуществляются глубокий регрессивный метаморфоз внедрившегося мирацидия и его миграция к месту окончательного поселения в сердце моллюска, герминальный материал практически не претерпевает сколько-нибудь заметных изменений. И описанные выше секреторные, и собственно генеративные клетки не изменяются (рис. 3, А; см. вкл.). Сказанное относится и к количественному составу группы, и к ее положению в теле молодой спороцисты, которая еще во многом сохраняет черты организации, присущие мирацидиям.

Картина резко меняется на протяжении вторых суток. Главные изменения сводятся к трем основным моментам: паразиты увеличиваются в размерах, в их теле начинает формироваться шизоцель и одновременно «активизируются» герминальные элементы. С появлением щелевидного зачатка шизоцеля ранее вполне компактная группа секреторных и герминальных элементов «разрыхляется». Составляющие ее клетки

располагаются более свободно практически по всей длине тела спороцисты. Секреторные клетки при этом чаще всего оказываются смещенными к периферии. Складывается впечатление, что они становятся структурными элементами (специализированными цитонами) тегумента. Зрелые и дифференцирующиеся генеративные клетки занимают более центральное («осевое») положение.

Упомянутые при описании мирацидиев *E. caproni* две самые крупные генеративные клетки (первичные генеративные клетки, по терминологии Атаева — Атаев, 2000) приступают к дроблению, что несомненно свидетельствует о достижении ими стадии функциональной зрелости. Правда, формирующиеся эмбрионы в этот период состоят всего лишь из 2—4 бластомеров.

На третьи сутки в спороцистах, локализующихся непосредственно в сердце, окончательно формируется обширный шизоцель (рис. 3, Б). Дифференцируются быстро увеличивающиеся в числе клеточные элементы «стенки тела». Правда, рыхлые скопления соматических клеток («паренхимные островки») еще сохраняются. В этот же период начинается пролиферация недифференцированных клеток, занимавших у личинки самое каудальное положение. При этом вновь образующиеся клетки частично дифференцируются в генеративные (вторичные генеративные клетки, по терминологии Атаева), что приводит к росту общего числа генеративных элементов, частично же в структурные клетки (Добровольский и др., 1983). За счет последних в зоне размножения недифференцированных клеток формируется довольно мощный «паренхиматозный» матрикс, который становится основой окончательно формирующейся герминальной массы. Последняя в дальнейшем, по мере увеличения объема шизоцеля и редукции значительной части соматических («паренхимных», или интерстициальных, по терминологии Пана — Pan, 1980) клеток приобретает вид прикрепленной герминальной массы. Это состояние сохраняется и на последующих этапах развития (рис. 3, Е). Первые эмбрионы заметно увеличиваются в размерах. На их поверхности формируется зародышевая мембрана, и они в своем развитии достигают стадии зародышевого шара (рис. 3, Б).

Развитие МС, которые по тем или иным причинам не смогли достичь специфического для себя места поселения, задерживается. В конце 3-х суток по своему строению и состоянию герминального материала они похожи на 2-суточных (рис. 3, В).

К исходу 4-х суток (рис. 3, Г) увеличившийся в объеме шизоцель оказывается заполненным довольно значительным количеством эмбрионов, из которых размерами и степенью развития выделяются два, сформировавшихся из 2 самых крупных генеративных клеток мирацидия. Остальные зародыши заметно отстают в своем развитии и образуют своего рода «возрастной» ряд — от самых мелких, состоящих всего из нескольких бластомеров, до более крупных, хотя еще и не достигших стадии начала морфогенеза. В составе герминальной массы в это время завершаются процессы дифференциации вторичных генеративных клеток, запас которых, однако, еще пополняется за счет продолжающейся пролиферации недифференцированных клеток.

На 7-й день после заражения (рис. 3, Д) первые зародыши практически завершают свой морфогенез в МС — у них уже хорошо различимы основные органы, присущие материнским редиам, и появляются первые эмбрионы следующего партеногенетического поколения. Отрождение первых материнских реди *E. caproni* происходит, как правило, через 8 дней после заражения моллюска.

В последующие 2—3 сут материнскую спороцисту покидают и остальные реди, развившиеся из первичных генеративных клеток. Общее их число в большинстве случаев не превышает 6. Однако размножение МС на этом не прекращается. Эмбрионы, формирующиеся в герминальной массе (рис. 3, Е), достигают стадии «зародышевого шара» и выходят в шизоцель. Общее количество зародышей, развивающихся из «вторичных» генеративных клеток, обычно колеблется от 6 до 10. Последних зародышей МС обычно отрождают через 2 недели после заражения моллюсков. Однако прекращение размножения вовсе не сопровождается их гибелью. При 26° паразиты остаются живыми еще в течение 6—9 дней. Более того, в их

герминальных массах еще формируется довольно много генеративных клеток, но давать начало нормально развивающимся эмбрионам последние по каким-то причинам уже не могут. Таким образом, репродуктивный потенциал МС заметно превышает их реальную продуктивность.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные позволяют рассмотреть несколько проблем, связанных с партенитами трематод. Прежде всего это относится к мирацидиям, причем не только представителей сем. Echinostomatidae, но и других таксонов. Чаще всего описания морфологии свободноживущей фазы развития МС основываются на результатах прижизненных наблюдений. Но у живых мирацидиев трудно идентифицировать секреторные и зрелые генеративные клетки. Это нелегко сделать и на постоянных препаратах (тотальных и сериях срезов, в том числе полутонких), если были использованы неадекватные красители (см. выше). На первых этапах выполнения настоящего исследования авторы сами допускали ошибки в трактовке природы тех или иных клеток. Только сопоставление результатов, полученных разными методами, включая электронную микроскопию, позволило надежно идентифицировать клеточные элементы разных типов.

Сказанное определяет комплекс проблем, связанных с сопоставлением данных, почерпнутых из разных литературных источников. Мы ограничимся анализом двух наиболее полных описаний и изображений эхиностоматидных мирацидиев, существующих в литературе, — *Petasiger* sp. (Гинецинская, 1968) и *Isthmiophora melis* (Dönges, 1973). Хотя секреторные элементы и изображены на рисунках, приведенных в цитированных работах, однако это не те секреторные клетки, о которых шла речь выше. Компактное герминальное образование, отмеченное у личинки *Petasiger* sp., явно включает несколько генеративных клеток, находящихся примерно на одной стадии дифференциации (судя по рисунку — не менее трех; Гинецинская, 1968; рис. 6, В; с. 33), и один эмбрион.

У мирацидия *I. melis* в задней части тела изображено несколько симпластических масс, содержащих разное количество ядер (от 2 до 8) (Dönges, 1973; p. 219). Иногда так рисуют эмбрионы, находящиеся на ранних стадиях дробления. Ни одной «одиночной» генеративной клетки на рисунке нет. Что же касается подрисовочных подписей к этим рисункам и описаний, то в обоих случаях авторы указывают, что у личинок есть генеративные (зародышевые, по: Гинецинская, 1968; Keimzellen, по: Dönges, 1973) клетки, и не упоминают о наличии эмбрионов.

Конечно, отмеченные на рисунках различия в степени дифференцировки герминального материала можно объяснять тем, что рассматриваемые мирацидии относятся к разным таксонам. Это вполне возможно, что подтверждают не только результаты настоящего исследования, но и пример других групп. На нескольких представителях сем. Plagiorchiidae и Ochetosomatidae было показано, что различия по этому признаку могут проявляться не только у разных видов одного рода, но и между разными особями одного вида (Добровольский и др., 1983).

Однако сказанное вряд ли относится к описанным в настоящей работе секреторным элементам. Учитывая единство плана строения, присущее мирацидиям сосальщиков, относящихся к таксонам достаточно высокого ранга (Dobrovolskij, 1965), можно предположить, что отмеченные у мирацидиев видов рода *Echinostoma* крупные секреторные клетки, топографически сближенные с герминальными элементами, имеются у представителей и других родов. Однако их большое внешнее сходство со зрелыми генеративными клетками, по-видимому, послужило причиной того, что авторы более ранних работ при описании мирацидиев не различали клетки этих двух типов. Естественно, что секреторные клетки при этом попадали в группу герминальных элементов.

И наконец, отсутствие в цитированных выше работах Гинецинской и Денгеса соответствия между описаниями и подрисовочными подписями, с одной стороны, и

иллюстрациями, с другой, заставляют сомневаться в достоверности и того и другого. К сожалению, все это, вместе взятое, пока исключает возможность использовать в последующем анализе более широкий круг видов эхиностоматид, в том числе и виды, упомянутые выше.

Полученные данные позволяют коснуться еще одного важного вопроса. Можно считать установленным, что универсальным органом размножения партенит являются так называемые герминальные массы, впервые детально изученные Кортм (Cort, 1944; Cort e. a., 1954). В настоящее время достаточно подробно исследованы особенности их организации и функционирования (Добровольский и др., 1983; Галактионов, Добровольский, 1998). Долгое время считалось, что по своей природе эта структура представляет собой новообразование, вторично возникшее как приспособление для пролонгирования сроков отрождения партенитами особей следующего поколения и не гомологичное яичнику марит (Добровольский, 1975; Добровольский и др., 1983). Развитие герминальной массы у редий и спороцист в онтогенезе связывали с процессом формирования у последних шизоцеля.

Однако анализ организации герминального материала мирацидиев рода *Echinostoma* показал, что и в этом случае мы имеем дело с типичной герминальной массой, которая практически не отличается от «погруженных» герминальных масс некоторых редий. Закладка, формирование и начало функционирования этого образования приходится на период морфогенеза мирацидия. Именно в это время происходит пролиферация недифференцированных клеток, начинается дифференцировка («созревание») генеративных клеток, а в некоторых случаях (например, у *E. paraensei*, а скорее всего, и у многих других эхиностоматид) может осуществляться и дробление последних.

Завершение морфогенеза мирацидия и весь период его свободного существования знаменуются полной остановкой этих процессов, которые возобновляются только на паразитической фазе развития МС, но далеко не у всех сосальщиков (Добровольский и др., 2000). Таким образом, у эхиностоматид реализация генеративной функции особями первого партеногенетического поколения оказывается разбитой на два этапа. На первом из них доминируют пролиферация первичных недифференцированных клеток и дифференцировка собственно генеративных клеток, иногда сопровождаемые началом дробления одной из них. На втором, уже после перехода развивающегося организма к существованию в моллюске, эти процессы быстро заканчиваются и главной функцией материнской спороцисты становится «выводковая» — в ней завершаются начальные этапы онтогенеза партенит следующей генерации.

Сказанное выше заставляет нас еще раз вернуться к вопросу о природе герминальной массы. Думается, что в настоящее время считать герминальную массу адаптивным по своей природе новообразованием, вторично приобретенным партенитами, уже нельзя. Крайне ранние закладка и начало функционирования этого органа, удивительное сходство его структуры со структурой яичника марит, наличие практически у всех детально изученных в этом отношении партенит, представляющих самые разные таксоны, — все это, вместе взятое, заставляет нас предполагать гомологию герминальной массы и яичника особей гермафродитного поколения. В то же время различные модификации герминальной массы, широко встречающиеся у партенит разных видов трематод, несомненно вторичны и адаптивны по своей природе. Это же относится и к приобретению герминальными массами партенит подавляющего большинства сосальщиков функции выводковой камеры (Добровольский и др., 1983).

Анализируя возможные варианты динамики размножения материнских спороцист, мы уже писали о том, что эхиностоматиды занимают своего рода промежуточное положение между большой группой архаичных трематод, с одной стороны, и большинством «высших» трематод — с другой (Добровольский и др., 2000). Проявления «педогенеза» у них выражены значительно слабее (см. ниже), чем у представителей Fasciolidae, Transversotrematidae и тем более Philophthalmidae или Cyclocoelidae, у которых собственно генеративная функция поколения МС полностью реализуется еще в период развития мирацидия (Добровольский и др., 2000). В то же время у эхиностоматид вклад паразитической фазы развития в репродукцию МС относительно

невелик. В этом отношении они сильно уступают МС отрядов Strigeidida и Plagiogchiida, у которых генеративная функция практически целиком осуществляется на паразитической фазе в моллюске-хозяине.

Не вызывает сомнений, что «крайние» формы — результат вторичной специализации. Однако рассматривать МС эхиностоматид как исходно примитивные, сохранившие в неизменном виде наиболее архаичные особенности процесса размножения, тоже нет серьезных оснований. Мы уже ранее писали (Добровольский и др., 2000) о том, что, по-видимому, исходной функцией паразитической фазы развития МС была «выводковая» — переход к «живорождению» обусловил необходимость в «вынашивании» эмбрионов следующего поколения в возникающей для этой цели зародышевой полости (шизоцеле). А МС эхиностоматид уже приобрели пока еще слабо выраженную способность к размножению на паразитической фазе развития. Это очень важное «достижение», ибо одним из главных направлений последующей эволюции сосальщиков и было резкое увеличение репродуктивного вклада всех поколений партенит, в том числе и МС. Вместе с тем у МС эхиностоматид нередки и проявления педогенеза.

Легко выстраивается ряд, иллюстрирующий постепенное усиление «педогенетической природы» мирацидиев. Открывает его *E. caproni*. Строго говоря, у мирацидиев этого вида какие-либо проявления «педогенеза» отсутствуют: герминальный материал представлен герминальной массой, лишенной зоны дробления. В ее состав, как уже говорилось выше, входят лишь недифференцированные, созревающие и 2 зрелые генеративные клетки, которые приступают к дроблению практически сразу после завершения миграции и достижения паразитом места окончательного поселения в моллюске-хозяине. По-видимому, раннее и интенсивное развитие зародышей из «первичных» генеративных клеток при отсутствии у этих древних и архаичных паразитов эффективных механизмов эксплуатации хозяина обуславливает быстрое истощение материнской спороцисты и соответственно невозможность полной реализации ее репродуктивного потенциала. О последнем свидетельствует отмеченная ранее избыточность продуцирования генеративных клеток герминальной массой.

Следующей в этом ряду оказывается *E. paraensei*, у которой факультативно (во всяком случае у исследованной лабораторной культуры) одна генеративная клетка обгоняет в своем созревании все остальные и приступает к дроблению еще до завершения морфогенеза мирацидия. В дальнейшем этот эмбрион сильно обгоняет в своем развитии остальные зародыши, которые начинают формироваться только на паразитической фазе развития материнской спороцисты. Он же первым и отрождается материнским организмом, причем это происходит раньше, чем появляются первые редии в моллюсках, зараженных *E. caproni* (Lie, Bash, 1967; Sapp e. a., 1998). Развитие этой «преждевременной материнской редии» («precocious mother redia») заметно тормозит, хотя и не подавляет полностью, развитие остальных редий в материнской спороцисте (Sapp e. a., 1998). С некоторым отрывом во времени развиваются и другие зародыши, продуцируемые материнской спороцистой (Ataev e. a., 1997; Атаев, 2000).

Третье звено в этой цепи — облигатное присутствие эмбрионов у мирацидиев. Этот феномен описан у широкого круга видов трематод, относящихся к разным семействам (см. обзоры: Peatson, 1972; Галактионов, Добровольский, 1997; Добровольский и др., 2000), хотя далеко не все данные такого рода заслуживают полного доверия. Без сомнения, это имеет место у представителей Fasciolidae и Transversotrematidae; представители же более специализированных семейств Allocreadiidae, Nemiuridae, Notocotylidae, Paragonimidae, Clinostomatidae и др. нуждаются в детальном переисследовании. Особый интерес вызывает размножение МС *Fasciola hepatica*. Во-первых, их генеративная функция полностью реализуется еще в период развития мирацидия — паразитическая фаза МС служит лишь выводковой камерой. Во-вторых, в литературе существуют две точки зрения по поводу судьбы формирующихся эмбрионов. Согласно одной из них, все эмбрионы и генеративные клетки, имеющиеся еще у мирацидия (или по крайней мере большинство. — *Примеч. авт.*), завершают свое развитие в МС и дают начало редиям (Скрябин, 1948; Mattes, 1949, и др.). В ряде же исследований (Czapsky, 1978; Kostova, Chipev, 1991, и др.) постулируется, что

только один — самый крупный эмбрион мирацидия нормально развивается в редию. Остальные эмбрионы и еще не приступившие к дроблению зрелые генеративные клетки постепенно резорбируются.

Конечно, более старые данные нуждаются в серьезной экспериментальной проверке, но очень вероятно, что в природе реализуются оба варианта. Речь может идти о разных подвидах (Скрябин, 1948) или географических расах *F. hepatica*. Нельзя исключить и простой вариабельности этого признака: ведь у *E. paraensei* даже в рамках одной культуры формирование в мирацидии эмбриона «преждевременной материнской редии» — явление факультативное.

Отрождение МС одной редии и гибель всех остальных зародышей описаны и у *Trasversotrematidae* (Cribb, 1988), однако судить о степени облигатности рассматриваемого феномена в пределах этого небольшого семейства мы пока не можем.

Замыкают ряд представители сем. *Philophthalmidae* и *Cyclocoelidae* с их облигатно «живородящими» мирацидиями, содержащими по одной сформированной и готовой к самостоятельному существованию в моллюске редии.

Трактовка приведенного выше ряда напрашивается сама собой — речь идет о становлении педогенеза в процессе эволюции материнского поколения партенит трематод. Однако это простое объяснение вряд ли может быть признано удовлетворительным. Мы уже писали о том, что мирацидии практически всех исследованных к настоящему времени архаичных трематод являются генеративно зрелыми организмами, зачастую полностью завершившими свое размножение (Добровольский и др., 2000). Все последующие события, связанные с развитием и функционированием паразитической фазы МС, это проявление анаболии.

Личинками мирацидии примитивных сосальщиков могут считаться только с «биологической точки зрения», поскольку выполняют расселительную функцию. Но в этом случае теряет смысл и широко используемая в литературе формулировка «педогенетические личинки» для обозначения мирацидиев филофталмид, циклоцелид и, возможно, некоторых других трематод. Педогенез по своей природе — явление вторичное, ибо возникает в результате приобретения истинной личинкой способности к преждевременному размножению путем партеногенеза. Мирацидии архаичных трематод, на наш взгляд, не приобрели, а всего лишь сохранили в процессе перехода к паразитированию в моллюсках способность к размножению, исходно присущую предковым формам (Добровольский и др., 2000).

Сказанное в какой-то мере уточняет наши представления о природе мирацидиев, но не дает ответа на вопросы, какое звено в рассмотренном ряду полнее других воспроизводит анцестральное состояние и каковы возможные причины, заставившие древних трематод эволюционировать в двух диаметрально противоположных направлениях. Поискам ответов на эти вопросы будет посвящена отдельная публикация.

Настоящая работа поддержана грантами программы «Университеты России — фундаментальные исследования» (грант № 2.3.3.3 (62)), Мин. образования РФ (Е-00-6.0-181) и РФФИ (грант № 98-04-49706).

Авторы выражают искреннюю благодарность проф. К. Комбу (С. Combes, Франция) и д-ру Ж. Жордану (J. Jourdane, Франция) за предоставленную возможность использовать культуры и лабораторную базу Перпеньянского университета. Мы особо признательны д-ру А. Фурнье (A. Fournier, Франция) за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований.

Список литературы

- Атаев Г. Л. Развитие партенит трематод: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. СПб., 2000. 34 с. (Атаев Г. Л., Добровольский А. А., Фурнье А., Жордан Ж.) Ataev G. L., Dobrovolskij A. A., Fournier A., Jourdane J. Migration and development of mother sporocysts of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae) // *J. Parasitol.* 1997. Vol. 13, N 3. P. 444—453.

- Галактионов К. В., Добровольский А. А. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод. СПб.: Наука, 1998. 404 с.
- Гинецинская Т. А. Трематоды. Их жизненные циклы, биология и эволюция. Л.: Наука, 1968. 411 с.
- (Добровольский А. А.) Dobrovolskij A. A. Über die Eintheiligkeit des Bauplanes von Mirazidien der Überfamilie Plagiorchioidea // *Angew. Parasitol.* 1965. Bd 6. S. 157—165.
- Добровольский А. А. Некоторые закономерности эволюции материнских спороцист трематод подотряда Plagiorchiata // *Экол. и эксперимент. паразитол.* Вып. 1. Л.: Изд-во ЛГУ, 1975. С. 96—108.
- Добровольский А. А., Галактионов К. В., Атаев Г. Л. Особенности организации генеративного материала и динамика размножения материнских спороцист трематод // *Паразитология.* 2000. Т. 34, вып. 1. С. 14—24.
- Добровольский А. А., Галактионов К. В., Мухамедов Г. К., Синха Б. К., Тихомиров И. А. Партегенетические поколения трематод // *Тр. Ленингр. о-ва естествоиспытателей.* 1983. Т. 82, вып. 4. 108 с.
- Скрябин К. И. Надсемейство Fascioloidea Stiles et Goldberger, 1910 // *Трематоды животных и человека. Основы трематодологии.* Т. 2. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1948. С. 7—336.
- Chapsky Z. New observations on the life cycle of *Fasciola hepatica* L. in *Galba truncatula* O. F. Muller, *Galba occulta* Jack. and *Galba turricola* Held. // 4th Intern. Congr. Parasitol. Short commun. 1978. Sect. A. P. 10.
- Cheng T. C. Studies on the morphogenesis, development and germ cell cycle in the sporocysts and cercariae of *Glyphelmis pennsylvaniensis* Cheng, 1961 (Trematoda: Brachycoelidae) // *Proc. Penn. Acad. Sci.* 1961. Vol. 35. P. 10—22.
- Cort W. W. The germ cell cycle in the digenetic trematodes // *Quart. Rev. Biol.* 1944. Vol. 19. P. 275—284.
- Cort W. W., Ameel D. J., Van der Woude A. Germinal development in the sporocysts and rediae of the digenetic trematodes // *Exp. Parasitol.* 1954. Vol. 3, N 2. P. 185—225.
- Gribb T. H. Life cycle and biology of *Prototransversotrema steeri* Angel 1969 (Digenea: Transversotreematidae) // *Austr. J. Zool.* 1988. Vol. 36. P. 111—129.
- Dönges J. Das miracidium von *Isthmiophora melis* (Schrank, 1788) (Echinostomatidae). Ökologie und Morphologie // *Z. Parasitenk.* 1973. Bd 41. S. 215—230.
- Kostadinova A., Gibson D. I. The systematics of echinostome // *Echinostomes as experimental models for biological research.* Kluwer: Acad. Press, 2000. P. 31—57.
- Kostova T. V., Chipev N. H. A model of the dynamics of intramolluscan trematode populations: some problems concerning oscillatory behavior // *Computers Math. Applic.* 1991. Vol. 21. P. 15.
- Langeron M. *Precis de microscopie.* Paris: Masson et Cie, 1949. 430 p.
- Lie K. J., Bash P. F. The life history of *Echinostoma paraensei* sp. n. (Trematode: Echinostomatidae) // *J. Parasitol.* 1967. Vol. 53. P. 1192—1199.
- Mattes O. Wirtsfindung, Invasionsvorgang und Wirtspecifität beim Fasciolamiracidium // *Z. Parasitenk.* 1949. Bd 14. S. 320—363.
- Morgan J. A. T., Blair D. Nuclear rDNA ITS sequence variation in the trematode genus *Echinostoma*: an aid to establishing relationships within 37 collar-spined group // *Parasitology.* 1995. Vol. 111. P. 609—615.
- Morgan J. A. T., Blair D. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial CO1 and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma* species (Trematoda) // *Parasitology.* 1998. Vol. 116. P. 289—297.
- Pan S. C. The life structure of the miracidium of *Schistosoma mansoni* // *J. Invertebr. Pathol.* 1980. Vol. 36. P. 307—372.
- Pearson J. C. A phylogeny of life-cycle patterns of the Digenea // *Adv. Parasitol.* 1972. Vol. 10. P. 153—189.
- Sapp K. K., Meyer K. A., Loker E. S. Intramolluscan development of the digenean *Echinostoma paraensei*: rapid production of a unique mother redia that adversely affects development of conspecific parasites // *Invertebr. Biol.* 1998. Vol. 117. P. 20—28.

СПбГПУ им. А. И. Герцена;
СПбГУ, Санкт-Петербург, 199034;
Университет Нью-Мехико, США

Поступила 15.02.2001

THE ORGANIZATION OF GERMINAL MATERIAL AND DYNAMICS
OF MOTHER SPOROXYST REPRODUCTION IN THE GENUS ECHINOSTOMA
(TREMATODA: ECHINOSTOMATIDAE)

G. L. Ataev, A. V. Avanesian, E. S. Loker, A. A. Dobrovolskij

Key words: trematodes, parthenites, mother sporocyst, miracidium, germinal elements, proliferation dynamics, pedogenesis.

SUMMARY

The reproduction in the first parthenogenetic generation — mother sporocyst (MS) in two species of echinostomes (*E. caproni*, *E. paraensei*) is investigated.

A group of densely packed cells, which noticeably differ from others, occupies the posterior part of the miracidium. They are characterized by large sizes and a large bubble-shaped nucleus with heterogeneous nucleolus and strong dispersed chromatin. The use of histological and electron microscopic methods has shown that with observed similarity these cells are classified in two types and have a completely different origin.

First of all, large secretory cells stand out. In *E. caproni* miracidia their number averages 6.8 ± 0.2 and linear sizes is 10—12 μm . Secretory cells possess a large bubble-shaped nucleus. The karyoplasm looks optically empty because of strong dispersion of chromatin. A large nucleolus occupies a bit eccentric position. Eosinophilic cytoplasm contains poorly noticeable at light-optical level accumulations of small granules.

The second group of cells is represented by typical germinal cells (GC). The number of GC does not exceed six. Their polymorphy is well above that of secretory cells. The sizes of GC vary from 5.4 to 9 μm .

The largest cells (8.1—9 μm) occupy the front position and usually are located between secretory cells. Intensively basophilic cytoplasm surrounds bubble-shaped nucleus with a large nucleolus like border with uniforming thickness. The heterochromatin is evenly distributed over the karyoplasm. Its content of nuclei is more than that in nuclei of secretory cells. That is why they do not look optically empty. So, it is «mature» germinal cells.

Four or five cells are located directly behind «mature» cells. Their sizes are gradually decrease towards the posterior of the miracidium (the diameter of the smallest cells reaches 5.4 μm). Nuclei with a centrally located nucleolus are characterized by larger amount and more condensation of the heterochromatin than those in «mature» cells. Meanwhile, they concern to nuclei of bubble-shaped type. In general, all cells of second type represent the primary germinal cells distinguished by the stage of their differentiation.

Also, 2—3 undifferentiated cells occupy the most posterior part of the miracidium. Their sizes average $5.55 \pm 0.18 \mu\text{m}$. The nucleus contains a lot of densely packed heterochromatin. On parasitic phase of MS development undifferentiated cells give rise to secondary GC.

Electron microscopic data in details confirm the situation described above. The essentially similar results were received during the investigation of *E. Paraensei* miracidia. The differences are observed in parametrical characteristics of germinal material and in small variability of the extent of germinal material development. With *E. paraensei*, germinal material may be represented by not only GC and undifferentiated cells, but one germ as well. So, our investigation has shown that germinal material of echinostomes represents typical germinal mass.

The germinal material condition does not change on parasitic phase of *E. caproni* MS development during the first day of post infection (PI). The activation of germinal material coincides in the time with the beginning of schizocoel formation in 2 Days PI. On the 3rd day of PI, the proliferation of undifferentiated cells begins and the first germs are free to float in enormous schizocoel. After 8 days of PI, MS release the first rediae. During the following 2—3 days the other rediae formed by primary GC left MS. The release of rediae derived from secondary GC was observed later. So, *E. caproni* MS give rise to 12—16 rediae which is much less than the number of GC formed in MS. The earlier release of the first *E. paraensei* rediae by MS is predetermined by the difference in the structure of germinal mass in *E. paraensei* miracidia.

Therefore, Echinostomatidae is intermediate between two groups of trematodes. The first group has MS that completely realize reproductive function in the time of miracidial formation; but the second group includes higher trematodes characterized by the transfer of reproductive time on a parasitic phase of MS development. The question concerning to so-called «pedogenetic larvae of trematodes» is discussed.

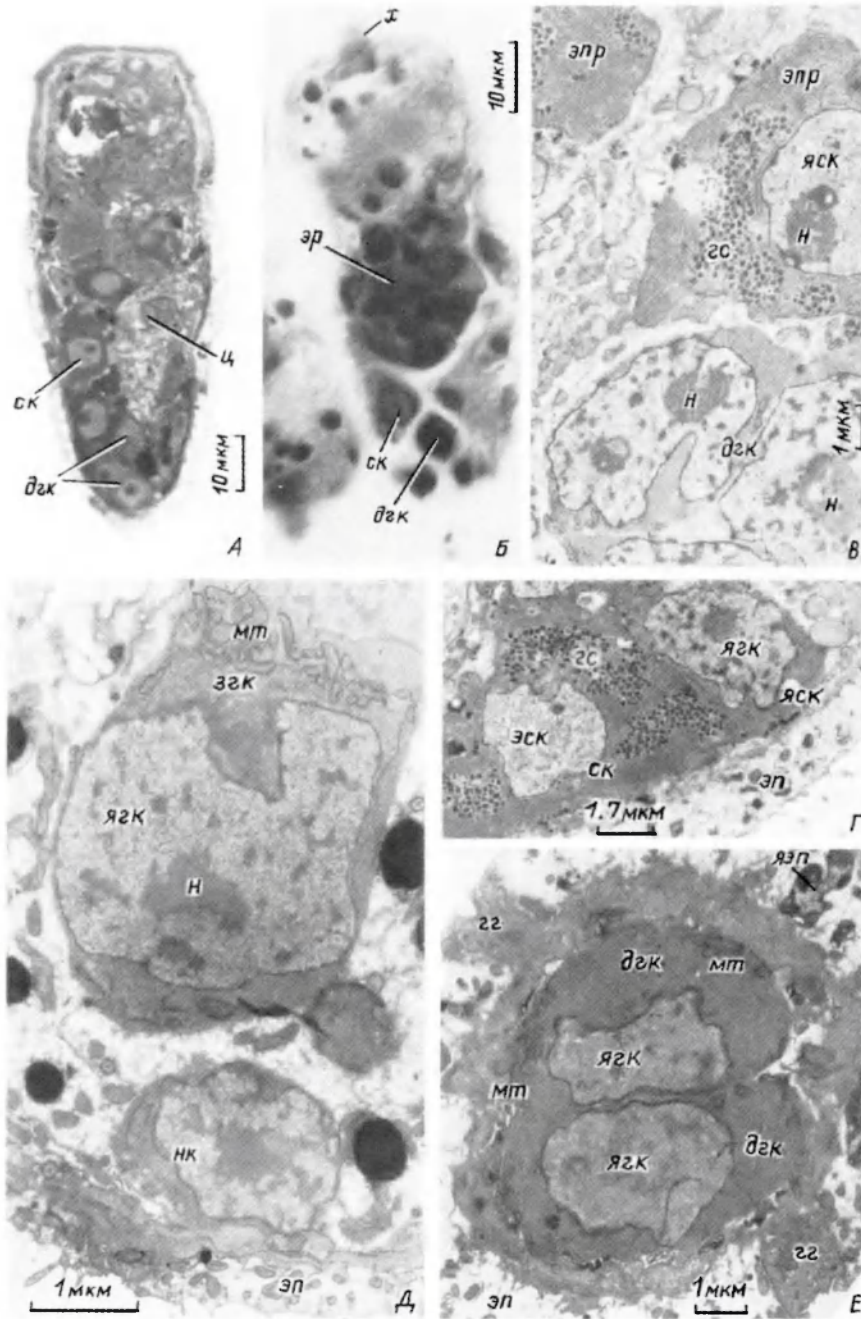


Рис. 2. Секреторные и генеративные клетки мирацидиев рода *Echinostoma*.

A — продольный срез через тело мирацидия *E. caproni* (полутонкий срез); *B* — продольный срез через тело мирацидия *E. paraensei* (парафиновый срез); *C—E* — срезы через тело мирацидия *E. caproni* в области расположения секреторных и генеративных клеток; *гг* — гиподермальный гребень; *гс* — гранулы секрета; *мп* — митохондрии; *н* — нуклеола; *х* — хоботок; *ц* — цитротрит; *эл* — эпителиальные пластинки; *эпр* — эндоплазматический ретикулум; *ягк* — ядра генеративных клеток; *яск* — ядра секреторных клеток; *яэп* — ядра эпителиальных пластинок.

Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 2. Secretory and germinal cells of miracidia of the genus *Echinostoma*.

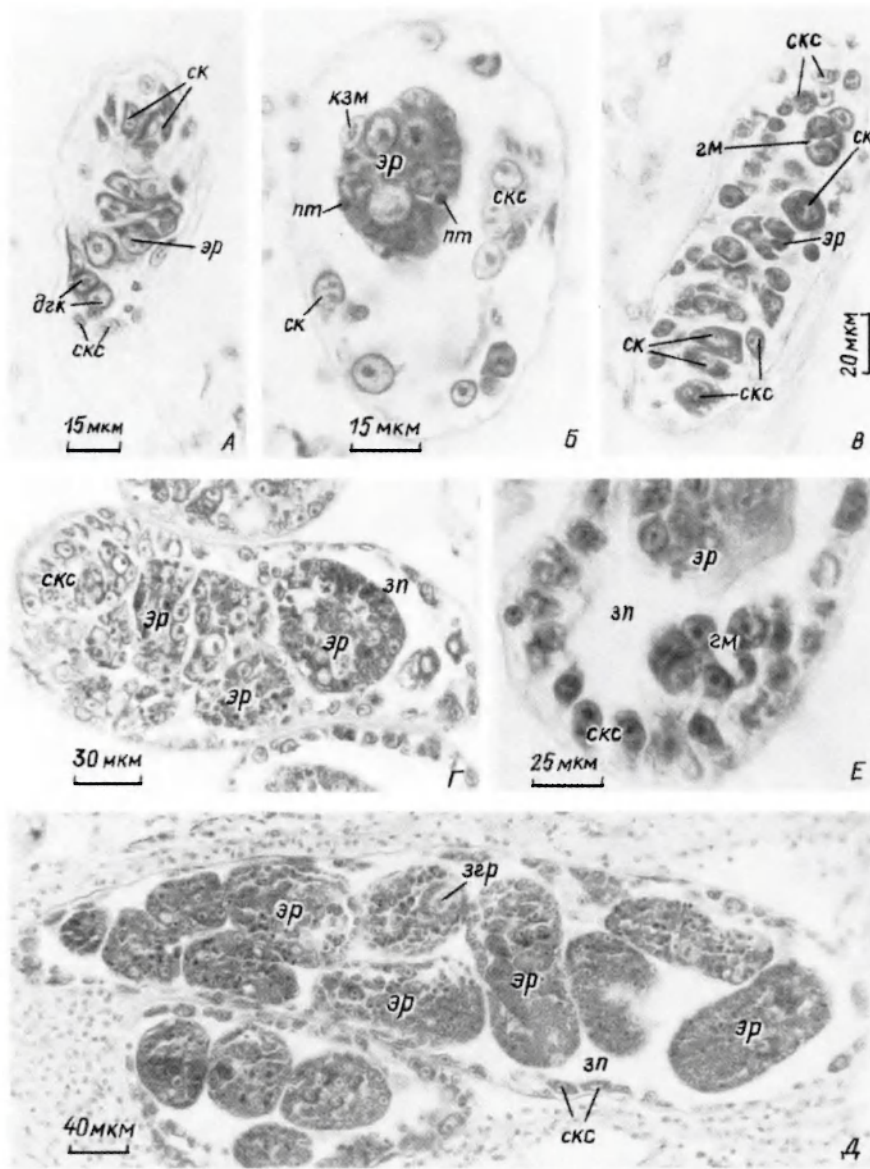


Рис. 3. Материнские спороцисты *Echinostoma caproni*.

А, Б — молодые материнские спороцисты (А — возраст 1 сут; Б — 3 сут); В — отстающая в развитии 3-суточная материнская спороциста из перикарда; Г, Д — зрелые материнские спороцисты (Г — возраст 4 сут; Д — 7 сут); Е — герминальная масса 10-дневной материнской спороцисты; зм — герминальная масса; кзм — клетки зародышевой мембраны; зэр — зачаток глотки реди; эл — зародышевая полость; пт — пикнотические тела в зародыше реди; скс — соматические клетки спороцисты.

Остальные обозначения такие же, как на рис. 1, 2.

Fig. 3. Mother sporocysts of *Echinostoma caproni*.