

УДК 576.8:611.018.1

***ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ
У DIGENEA (PLATYHELMINTHES: TREMATODA)***

Начева Л.В.

д.б.н., профессор,

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

г. Кемерово, Россия

Аннотация. Изучены цитогенетические основы изменчивости *Digenea* (Platyhelminthes: Trematoda) на примере двух видов *Eurytrema pancreaticum* и *Dicrocoelium lanceatum*. У половозрелых гермафродитных особей описана архитектоника половых желез, в которых протекает гаметогенез, особое внимание уделено процессу образования мужских половых клеток, показана рекомбинация генетического материала, происходящая в период сперматогенеза, что составляет основу комбинативной изменчивости у плоских червей.

Ключевые слова: цитогенетика, трематоды, половая система, гаметогенез, цитоархитектоника, изменчивость.

***CYTOGENETIC BASIS OF VARIABILITY IN
DIGENEA (PLATYHELMINTHES: TREMATODA)***

Nacheva L.V.

Doctor of Biological Sciences, Professor,

*FSBEI HE «Kemerovo State Medical University» of the Ministry of Health of
the Russian Federation,*

Kemerovo, Russia

Abstract. The cytogenetic basis of the variability of *Digenea* (Platyhelminthes: Trematoda) was studied on the example of two species *Eurytrema pancreaticum* and *Dicrocoelium lanceatum*. In sexually mature hermaphrodite individuals, the architectonics of the gonads in which gametogenesis occurs is described, special

attention is paid to the process of formation of male germ cells, and the recombination of genetic material occurring during spermatogenesis is shown, which is the basis for the combinative variability of in flatworms.

Keyword: cytogenetics, trematodes, reproductive system, gametogenesis, cytoarchitectonics, variability.

Введение. Независимо от того, что появляются новые технологии в медицине и биологии, научные исследования в области морфологии с применением гистологических методов окраски остаются актуальными. К сожалению, должны констатировать, что за 20 лет XXI не появилось ни одной обзорной статьи по состоянию изученности класса трематод. Одной из последних работ этого плана является доклад И. Е. Быховской-Павловской 1975 года, в котором сделан обширный анализ по исследованиям сосальщиков и показаны основные задачи дальнейшего развития трематодологии в целом [1]. Но отдельные, фрагментарные исследования по изучению морфологии половой системы дигенетических сосальщиков проводились в разных научных лабораториях [2, 3, 4], одной из которых является микроморфологическая лаборатория кафедры биологии с основами генетики и паразитологии Кемеровского государственного медицинского университета. У 25 видов сосальщиков изучали половую систему и у некоторых из них описана морфологическая картина гаметогенеза и обособленно описаны морфофункциональные особенности желточников трематод подотряда *Paramphistomatata*.

В целом опыт исследований показывает, что о многообразии видов трематод можно судить по микроморфологии органов репродуктивной системы, составляющей основу их размножения и сохранения как паразитических форм.

Интересные работы появились по ультраструктуре репродуктивных органов трематод. Была изучена ультраструктура желточных клеток, обеспечивающих развитие яиц возбудителя описторхоза [5], а также

ультраструктура вителлогенеза у *Aphallus tubarium* [7]. Даны ультраструктурные характеристики желточников *Brandesia turgida* и установлена потенциальная полезность вителлиновых признаков в систематике Дигеней [9]. Проведены исследования ультраструктуры желточных фолликулов двух видов трематод *Phyllodistomum angulatum* and *Azygia lucii* [10]. Установлено, что расположение желточников является идентификационным маркером для *Schistosoma mansoni* [14].

Не менее оригинальными следует считать работы по электронномикроскопическим исследованиям сперматогенеза у марит *Fasciola hepatica* [12], *Schistosoma mattei* [13], и сперматозоидов у трематод вида *Dicrocoelium dendriticum* [6]. Ультраструктурное исследование *Invenusta aestus* позволил автору показать, что изучение спермиогенеза имеет значение для филогении гельминтов [11].

Судя, по литературным данным, мы можем утверждать, что не все органы половой системы трематод изучены в равной степени и не со всех сторон. Фрагментарно показаны цитоархитектоника семенников и сперматогенеза, не раскрыты цитогенетические механизмы гаметогенеза и не сделаны акценты о значении этого процесса для трематод. В связи с этим изучение этих вопросов является актуальным.

Актуальным стало обсудить вопрос гаметогенеза как механизма комбинативной изменчивости на примере трематод семейства Дикроцелиид.

Цель исследований. Изучить цитогенетические особенности сперматогенеза и изменчивости трематод *Eurytrema pancreaticum* и *Dicrocoelium lanceatum*.

Материалы и методы. Гельминты из класса *Trematodes* (Трематоды), типа *Plathelminthes* (Плоские черви), виды *Eurytrema pancreaticum* и *Dicrocoelium lanceatum*, были набраны у овец на Алматинском мясокомбинате. Паразиты фиксировали в 10% нейтральном формалине. Использовали для обработки общепринятые гистологические методы. Дневник науки | www.dnevniknauki.ru | СМИ Эл № ФС 77-68405 ISSN 2541-8327

Заливали материал в парафин с добавлением воска. Готовили парафиновые блоки. Срезы, толщиной 5-6 мкм, помещали на обезжиренные предметные стекла и окрашивали гистологическими методами: гематоксилин Карацци-эозин, галлоцианин, аzur-эозин по Романовскому-Гимза. Было изготовлено по 150 гистологических микропрепаратов по каждому виду, которые изучали в световом микроскопе и делали микрофотосъемку.

Результаты исследований. В окончательном хозяине трематоды достигают половой зрелости в виде истинного гермафродитизма. Согласно сложной морфологии половой системы, сосальщиков следует относить к симультанным червям. Именно одновременное существование двух систем – мужской и женской у сосальщиков обеспечивает выполнение ими функции интегральной фокусной динамики. Синхронно или одновременно протекают сперматогенеза и овогенеза в каждой особи. В результате этих процессов происходит рекомбинация генами, и половые клетки получают неповторяющиеся наследственные данные. Следует отметить, что процесс оплодотворения у трематод происходит перекрёстным способом, за счёт чего мы можем констатировать ещё один из вариантов обмена генами. Соответственно, в этом случае, обновление связано с геномами сперматозоидов, которыми сосальщики обмениваются при копуляции. В каждой половозрелой особи – марите трематод после оплодотворения созревает их новая генерация с уникальными генотипами. Это так же один из вариантов получения генетического разнообразия паразитов. Гистологические методы позволяют изучить цитогенетику процессов сперматогенеза и описать картину цитоархитектоники семенников, что раскрывает механизмы изменчивости сосальщиков.

Мы изучили цитогенетические особенности сперматогенеза у двух представителей класса Трематод – *Eurytrema pancreaticum* и *Dicrocoelium lanceatum*. Развитие мужских половых клеток протекает у эуритрем в хорошо развитых семенниках (рис.1). Морфометрические данные показали, что

Дневник науки | www.dnevniknauki.ru | СМИ Эл № ФС 77-68405 ISSN 2541-8327

размеры клеточных форм при сперматогенезе в семенниках несколько отличаются между эуритремами и дикроцелиями, но имеют принципиально однотипную схему преобразований.

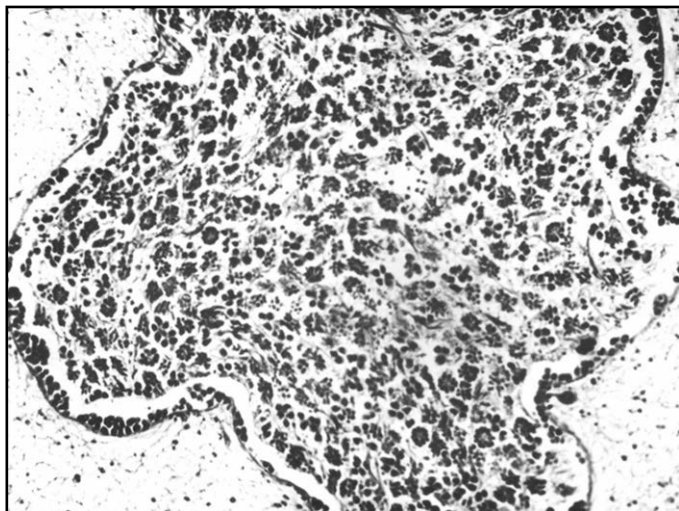


Рис 1. Семенник *Eurytrema pancreaticum*. Общий вид.

Окраска гематоксилином-эозином.

Микрофото. Об. 40 х Ок.7.

В их семенниках по всей внутренней поверхности пристеночно располагается зона размножения в виде сплошного слоя. Он состоит из первичных диплоидных клеток, которые делятся митозом, превращаясь в сперматогониев, которые имеют набор хромосом $2n2c$. По форме эти клетки округлые, слегка деформированные за счёт их большого скопления и взаимного давления друг на друга в этой зоне. Размеры сперматогониев колеблются от 9,8 до 14 мкм у эуритрем и от 8,4 до 11,2 у дикроцелий. Ядра этих клеток овальной или круглой формы с хорошо выраженными зёрнами хроматина, но без видимого ядрышка. Размеры ядер составляют 5,7 - 8,3 мкм у эуритрем и 3,9 – 4,7. В период пролиферации сперматогоний за счёт митоза образуются первичные, вторичные и третичные сперматогонии, которые по размерам почти не отличаются от первичных стволовых клеток, называемых в половой железе гоноцитами, и сохраняют хромосомный набор $2n2c$. Наиболее существенным отличием является то, что в результате митозов цитоплазма образующихся сперматогониев разделяется не

полностью и, между ними образуются цитоплазматические мостики и образуются клоны. Таким образом, первичные сперматогонии образуют клон из двух клеток, вторичные сперматогонии - клон из четырёх клеток и третичные сперматогонии - клон из восьми клеток. Центральное место в каждом клоне занимает небольшое цитоплазматическое тело - цитофор. Деление клеток происходит в разных плоскостях, с каждым разом общее количество их в клоне увеличивается и сам клон приобретает шарообразную форму. В этих шаровидных клонах первичные сперматогонии имеют вытянутую форму, заостренная часть их апикальных концов направлена в сторону создания цитоплазматических мостиков, которые удерживают клетки вместе. Размеры этих клеток примерно равны 8,4 - 9,8 мкм у эуритрем и несколько меньше у дикроцелий. Когда происходит следующее митотическое деление, сперматогонии уже называются вторичными (рис.2).

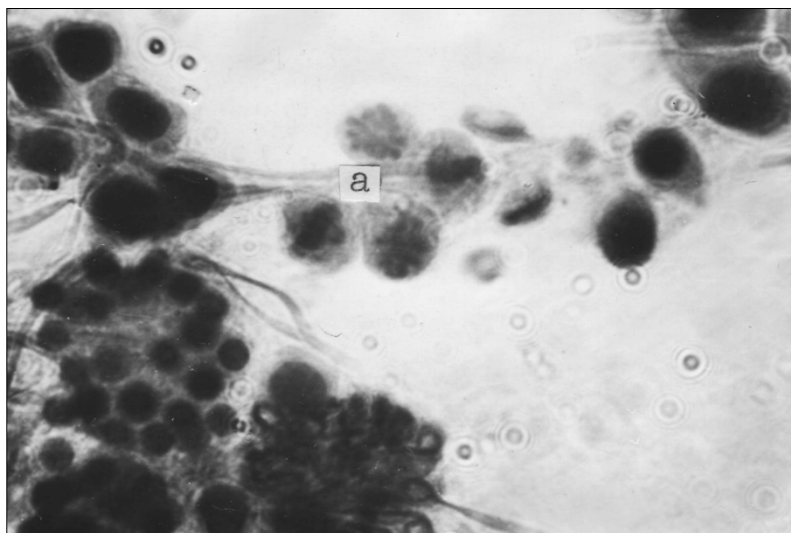


Рис 2. Сперматогенез *Eurytrema pancreaticum*

а) 4-х клеточная стадия, вторичные сперматогонии.

Окраска гематоксилином- эозином.

Микрофото. Об. 40 х Ок.7.

Мы чётко фиксируем увеличение их размеров, а они самые большие размеры из гониальных форм и составляют 14,0-16,8 мкм у эуритрем и чуть меньше у дикроцелий. В это время соответственно диаметр клона достигает 22,4 мкм и 20,1 мкм. Митотическое деление в зоне размножения продолжается, появляются третичные сперматогонии, которые меньше вторичных (5,6 - 8,4 мкм у эуритрем и 4,9- 7, 3 у дикроцелий), причём размеры клона также уменьшаются по сравнению с клонами вторичных сперматогониев. Клоны содержат по 16 клеток.

Следующий период сперматогенеза – это рост третичных сперматогоний. Они увеличиваются в размерах, ядра приобретает набухший вид, и клетки превращаются в сперматоциты I порядка, размеры которых достигают 9,8 - 11,2 мкм у эуритрем и 8,7 – 10,1 у дикроцелий, а диаметр каждого из их клонов колеблется от 28,0 - 30,8 мкм и соответственно 26,3-28,9 мкм, причём размеры цитоплазмы также увеличиваются. Период роста соответствует интерфазе I мейоза I, в которой происходит удвоение ДНК, и подготовка к редукционному делению мейоза, превращение в сперматоциты I порядка с набором хромосом $2n4c$. Затем эти клетки вступают в первое деление мейозом, в результате которого сперматоциты проходят 4-е фазы – профазу I, метафазу I, анафазу I, телофазу I. Самые главные процессы – синапсис, конъюгация и кроссинговер мы наблюдали в профазе I, которые составляют фундаментальные основы изменчивости трематод. После первого мейотического деления сперматоциты I порядка дают начало 16 сперматоцитам второго порядка, которые уже содержат $1n2c$. Клоны из сперматоцитов II порядка еще не распадаются, но размеры их уменьшаются до 24 - 25 мкм у эуритрем и до 19-22 у дикроцелий. Далее следуют преобразования в мейозе II. И уже после второго эквационного мейотического деления образуются 32 сперматиды с $1n1c$, размеры которых будут 19,6 - 22,4 у *Eurytrema pancreaticum* и 18,9-20,8 у *Dicrocoelium lanceatum*. Установлено, что во время мейоза морфометрические изменения

Дневник науки | www.dnevnika.ru | СМН ЭЛ № ФС 77-68405 ISSN 2541-8327

наблюдаются не только у клеток, но и меняются размеры цитофора, и у сперматид достаточно чётко выявляются клеточные границы. В результате мейоза I и мейоза II происходит рекомбинация генов и сперматиды имеют новый набор генов, отличающийся от родительских пар, то есть всегда новый геном. На заключительной стадии сперматогенеза, когда идёт формирование сперматозоидов геном уже не меняется. Эта зона в семеннике характеризуется морфологическим оформлением сперматозоида. Сначала ядра сперматид, имеющие округлую форму с размерами у эуритрем 3,6 мкм и соответственно 2,9 у дикроцелий начинают постепенно удлиняться по направлению к цитофору.

Затем длина ядер сперматид увеличивается более чем вдвое, форма становится веретенообразной, клетки скручиваются в кольца и петли. Просматривается структура сперматозоидов. По мере дальнейшего удлинения хвостовой конец сперматозоида выходит из цитоплазменной массы наружу, постепенно увеличиваясь в длину, он полностью высвобождается из остатков цитоплазмы. В результате, из каждого клона сперматид формируется 32 сперматозоида и остаточное цитоплазматическое тело, которое некоторое время сохраняет размеры и форму клона, и в нём чётко видны клеточные границы. Затем происходит постепенное разрушение остаточного тела с распадом на мелкие эозинофильные шарики, которые затем рассасываются, но предположительно какое-то время они используются в качестве питания для развивающихся в семеннике клеток. Новые сперматозоиды, имеющие каждый уникальный набор генов, выводятся из семенника в семяпроводы, скапливаясь в семенных пузырьках, и находятся там до семяизвержения. При спаривании трематод сперматозоиды с новыми геномами попадают в семяприемник другого партнёра, что и указывает на генетическое обновление друг друга.

Выводы. Цитогенетические исследования *Eurytrema pancreaticum* и *Dicrocoelium lanceatum* показали, что архитектоника семенников у трематод
Дневник науки | www.dnevnikaui.ru | СМИ Эл № ФС 77-68405 ISSN 2541-8327

сложная и зависит от сперматогенеза, в результате которого происходит редукция числа хромосом и рекомбинация наследственного материала за счет мейоза, обеспечивая разнообразие геномов сперматозоидов в каждой особи паразитов. После оплодотворения происходит слияние гамет двух особей этой пары сосальщиков с образованием уникальных генотипов. Эти процессы составляют основу комбинативной изменчивости трематод и дают возможность им адаптироваться в организме хозяина, сохраняя явление паразитизма за счет проявления интегральной фокусной динамики репродуктивной функции.

Библиографический список:

1. Быховская-Павловская, И. Е., Состояние изученности класса трематод и основные задачи их исследования / И. Е. Быховская-Павловская, Т. А. Гинецинская // Паразитология, IX. 1. 1975. С.3-16.
2. Гребенщиков, В.М., Микроморфология и гистохимия половой системы и гаметогенеза трематод в норме и при действии антигельминтиков В.М. Гребенщиков, Л.В. Начева / Российская Академия Естествознания; Всероссийский институт гельминтологии им. академика К.И.Скрябина; Кемеровская государственная медицинская академия. Кемерово, 2008. – 118.
3. Гребенщиков, В.М., Сперматогенез – основа комбинативной изменчивости у трематод / Л.В. Начева, В.М. Гребенщиков // Сб. «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» (Международная научная конференция, Москва, 16–18 мая 2017). 2017. С. 306–308.
4. Начева, Л.В., Морфофункциональные особенности желточников трематод подотряда *Paramphistomatata Fischoider*. 1904 /Л.В. Начева, В.М. Гребенщиков // Российский паразитологический журнал. 2009 №2. С.24 - 26.
5. Начева, Л.В., Ультраструктура и гистохимия желточных клеток, обеспечивающих развитие яиц возбудителя описторхоза. / Л.В. Начева, В.М. Гребенщиков // Фундаментальная и клиническая медицина. 2018. 3(2):20-27.

6. Cifrian B., Garcia-Corrales P., Martinez-Alos S. Ultrastructural study of the spermatogenesis and mature spermatozoa of *Dicrocoelium dendriticum* (Plathelminthes, Digenea) 1993, Parasitology Research vol. 79, p. 204–212.
7. Greani S, Quilichini Y, Foata J, Marchand B. 2012. Ultrastructural study of vitellogenesis of *Aphallus tubarium* (Rudolphi, 1819) Poche, 1926 (Digenea: Cryptogonimidae), an intestinal parasite of Dentex (Pisces: Teleostei). Journal of Parasitology, 98, 938–943.
8. Nacheva L.V., Grebenshchikov VM. Histochemical studies of the trematodes vitelline gland // Proceedings of the Azerbaijan Zoological Society. 2013; 5(1): 167-170.
9. Poddubnaya L. G., Bruňanská M., Brázová T., Zhokhov A. E., Gibson D. I. Ultrastructural characteristics of the vitellarium of *Brandesia turgida* (Brandes, 1888) (Digenea: Pleurogenidae) and an examination of the potential usefulness of such vitelline traits in digenean systematic. Helminthologia, 2013, 50, 2: 119 – 126.
10. Poddubnaya LG., Bruňanská M, Świderski Z, Gibson DI. Ultrastructure of the vitellarium in the digeneans *Phyllodistomum angulatum* (Plagiorchiida, Gorgoderidae) and *Azygia lucii* (Strigeida, Azygiidae). Acta Parasitol. 2012; 57(3): 235-246.
11. Sopott-Ehlers B. On the spermiogenesis of *Invenusta aestus* (Platyhelminthes, Proseriata). An ultrastructural study with implications for plathelminth phylogeny. Zoomorphology. 1989.109:145-152.
12. Stitt, AW, Fairweather I. Spermatogenesis and the fine structure of the mature spermatozoon of the liver fluke *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea). Parasitology. 1990. 101:395-407.
13. Swiderski Z, Tsinonis N. Spermatogenesis in *Schistosoma mattei*. Proceedings of the XI th International Congress on Electron Microscopy. Kyoto. Japan. 1986: 3325-3326.

14. Wang J, Collins JJ 3rd. Identification of new markers for the *Schistosoma mansoni* vitelline lineage. Int J Parasitol. 2016; 46(7): 405-410.

Оригинальность 85%