

## КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

УДК 576.89

**Структура оболочек вокруг метацеркарий трематод *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) во втором промежуточном хозяине****Е.М. Скоробрехова** *Институт биологических проблем Севера, ДВО РАН, Россия, 685000, г. Магадан, ул. Портовая, д. 18  
e-mail: skorobrechova@mail.ru*

С использованием методов световой и трансмиссионной электронной микроскопии изучено строение капсулы и цисты, окружающих метацеркарии трематод *Podocotyle atomon* во вторых промежуточных хозяевах — *Locustogammarus locustoides* (Brandt, 1851) и *Spinulogammarus ochotensis* (Brandt, 1851). Показано, что образованная тканью хозяина капсула состоит из двух слоев: 1) электронно-светлого, рыхловатого, внутреннего и 2) электронно-темного, деструктурированного наружного слоя, включающего небольшое количество клеток и их фрагментов. Циста, образуемая самим паразитом, организована в виде единого аморфного слоя. Предполагается, что внутренний слой капсулы подокотилей образуется путем дегенерации и трансформации участка мышечного волокна амфиподы, в котором локализуется личинка, а ее наружный слой представлен отложениями пигмента.

**Ключевые слова:** ультраструктура, амфиподы, метацеркарии, циста, капсула, *Podocotyle atomon*

Трематоды *Podocotyle atomon* являются широко распространенными паразитами кишечника морских рыб. Вторыми промежуточными хозяевами этих трематод являются разные ракообразные; в частности, в бассейне Охотского моря их метацеркарии обнаруживали в амфиподах не менее чем 10 видов [1].

При описании тотальных препаратов метацеркарий *P. atomon* отмечается, что в теле ракообразных эти паразиты заключены в две легко отделяемые друг от друга оболочки: внутреннюю прозрачную цисту (формируемую паразитом) и наружную пигментированную капсулу (формируемую хозяином) [1]. Сведения о внутреннем строении цисты отсутствуют, о капсуле же имеются противоречивые данные. Согласно Успенской [2] на свето-микроскопических препаратах капсула состоит из нескольких слоев коричневого пигмента при отсутствии в ее составе клеточных элементов. Джеймс [3] при проведении эксперимента по заражению различных видов амфипод отметил, что инцистированные метацеркарии покрываются толстой фиброзной оболочкой. Коие [4] в эксперименте с амфиподами *Gammarus* sp., используя метод сканирующей электронной микроскопии, пришла к выводу, что капсула является видоизмененной мышечной тканью ракообразного. Цель настоящей работы состояла в изучении структуры цисты и капсулы метацеркарий *P. atomon* с применением световой и трансмиссионной электронной микроскопии.

**Материалы и методы**

Метацеркарии *P. atomon* были извлечены из амфиподов *L. locustoides* (Brandt, 1851) и *S. ochotensis* (Brandt, 1851), собранных в прибрежных участках бухты Нагаева Охотского моря. Личинок, окруженных цистой и капсулой, фиксировали и заключали в эпонаралдит в соответствии со стандартной электронно-микроскопической методикой. Полутонкие срезы (1–2 мкм), окрашивали смесью метиленового синего и кристаллического фиолетового и просматривали под световым микроскопом Olympus CX 41. Ультратонкие срезы изучали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1400 PLUS (JEOL, Япония).

**Результаты и обсуждение**

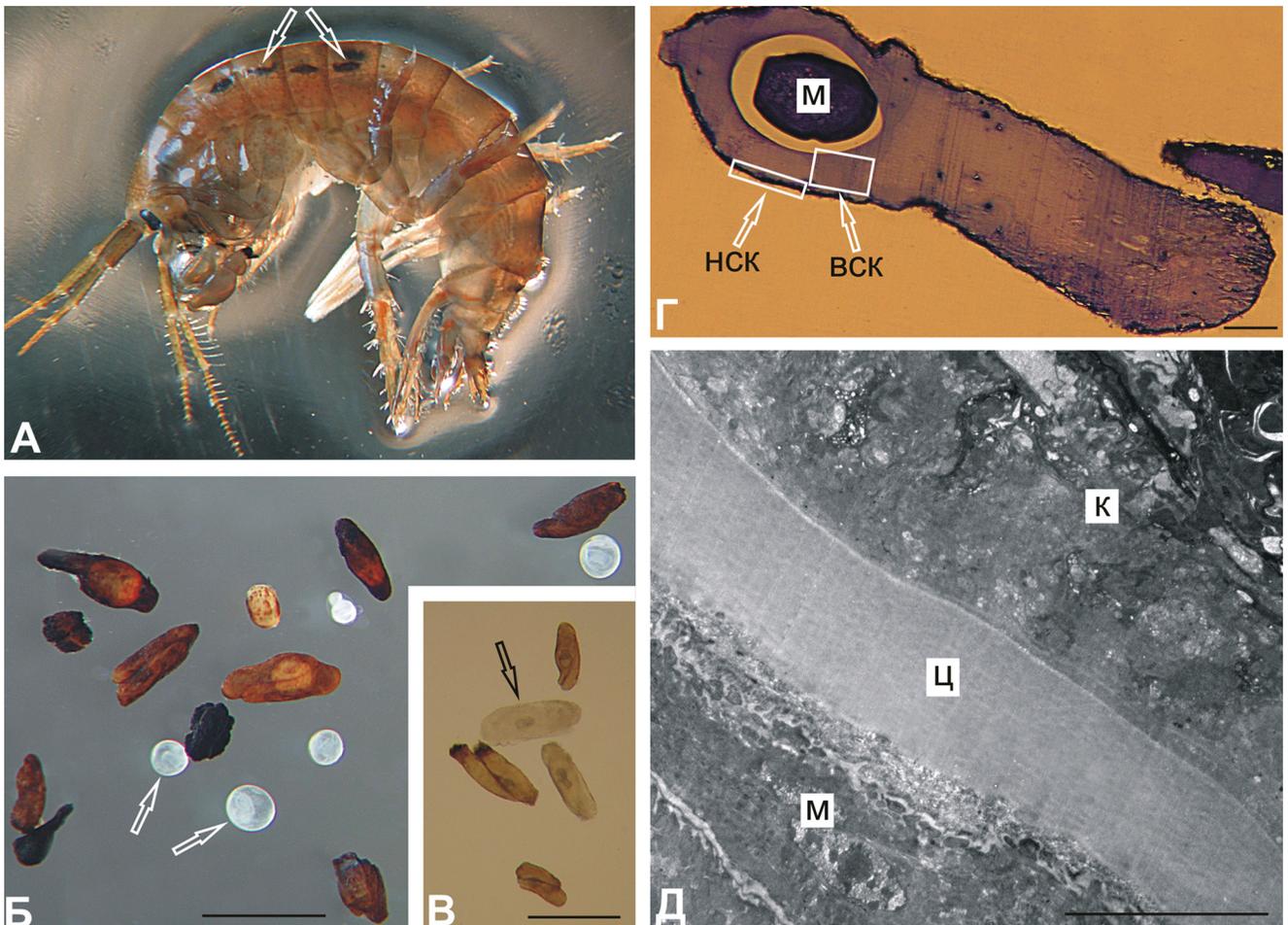
Всего было изучено 2237 амфиподов (853 *S. ochotensis* и 1384 *L. Locustoides*), из которых оказались зараженными 422 и 466 соответственно. Метацеркарии редко располагались в мышцах конечностей, чаще в гемоцеле, из которого свободно выделялись в процессе вскрытия ракообразного (рис. 1А).

**Морфология капсулы.** Капсулы с заключенными в них метацеркариями имели удлиненную (реже округлую) форму. Количество капсул, обнаруживаемых в одном рачке, варьировало от одного до семнадцати. Цвет их варьировал от светло-коричневого до темно-бурого, иногда черного (рис. 1Б), но в некоторых случаях капсулы были светлыми (рис. 1В). В одном рачке обнаружива-

лись как однотипные, так и одновременно светлые и окрашенные капсулы. Длина удлиненных капсул составляла приблизительно 0,5–1,0 мм, а ширина 0,2–0,4 мм, диаметр округлых капсул варьировал от 0,2 до 0,4 мм. В удлиненных капсулах гельминты располагались как в центре, так и ближе к одному из краев (рис. 1Г). В одной капсуле обычно располагалась одна инцистированная метацеркария, однако нередко в общей капсуле находили 2–4 личинок, каждая из которых была заключена в собственную цисту.

Строение стенки капсулы у подокоотилей из обоих исследованных видов амфипод сходно. В ее составе на полутонких срезах видны два отчетливых слоя: 1) внутренний – рыхловатый, светло-окрашенный и 2) наружный – деструктурированный, темный (рис. 1Г, 2). Основу внутреннего слоя капсулы составляют крупные, удлиненные тяжи, чаще бесструктурного, иногда тонкофибрилярного материала невысокой электронной плотности, разделенные более светлыми узкими участками (рис. 3А). В строении этого слоя редко встречались мелкие мембраноподобные образования и элект-

тронно-плотные тела, напоминающие липидные капли. Наружный слой капсулы состоит из электронно-плотной бесструктурной массы, напоминающей отложения пигмента (меланина) (рис. 3Б). На одних препаратах этот слой был тонким и слабо выраженным (рис. 1Г), на других – составлял более половины толщины стенки капсулы (рис. 2). Можно предполагать, что толщина наружного слоя капсулы связана с длительностью ее формирования. Если это предположение верно, то тогда светлая капсула с метацеркарией, вероятно, находится на ранней стадии формирования ее наружного слоя, и пигмент только начинает откладываться. В скоплениях пигмента наружного слоя были найдены фрагменты клеток (рис. 3В). У некоторых капсул небольшое количество пигмента было обнаружено внутри содержимого внутреннего слоя капсулы. На периферии капсулы изредка встречались небольшие группы клеток с выраженными признаками деструкции (рис. 3Г). В этих клетках были выявлены ядра с крупными скоплениями гетерохроматина вдоль внутренней мембраны, а также плотные фаголизосомы и мембранные тельца.



**Рис. 1.** А. *Spiculogammarus ochotensis*, сквозь покровы которого видны метацеркарии *Podocotyle atomon*, заключенные в пигментированные капсулы (стрелки). Б, В. Инкапсулированные метацеркарии, выделенные из гемоцеля амфиподы. Стрелками показаны: на рис. Б – личинки в прозрачных цистах, извлеченные из капсул, рис. В – метацеркария, заключенная в светлую капсулу. Г. Полутонкий срез инкапсулированной метацеркарии. Циста плотно прилегает к личинке, поэтому на снимке не видна. Д. Ультратонкий срез поверхностного участка метацеркарии и окружающих ее цисты и капсулы. ВСК – внутренний слой капсулы, К – капсула, М – метацеркария, НСК – наружный слой капсулы, Ц – циста. Линейка: Б, В – 1 мм, Г – 50 мкм, Д – 10 мкм.

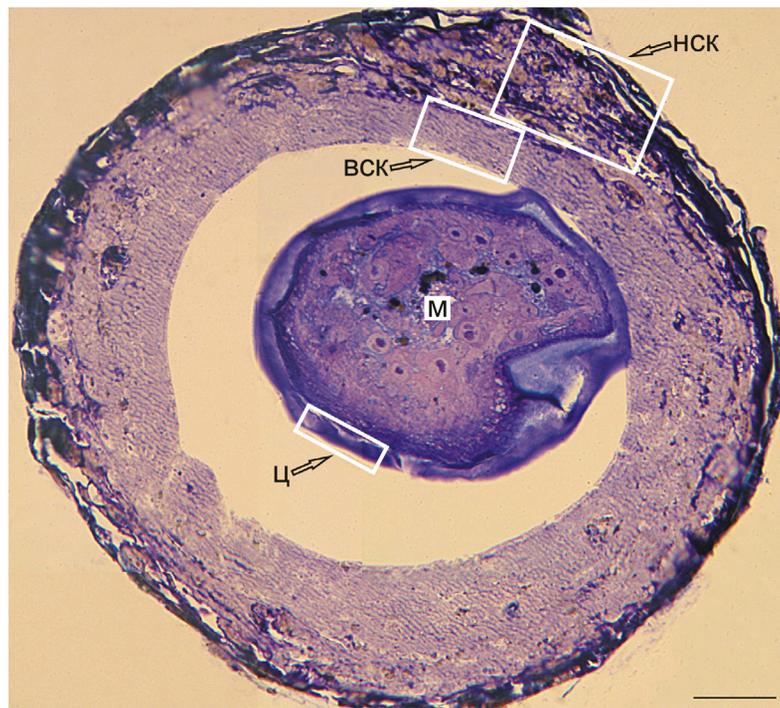


Рис. 2. Полутонкий срез инкапсулированной метацеркарии *P. atomon*. ВСК – внутренний слой капсулы, М – метацеркария, НСК – наружный слой капсулы, Ц – циста. Линейка: 20 мкм.

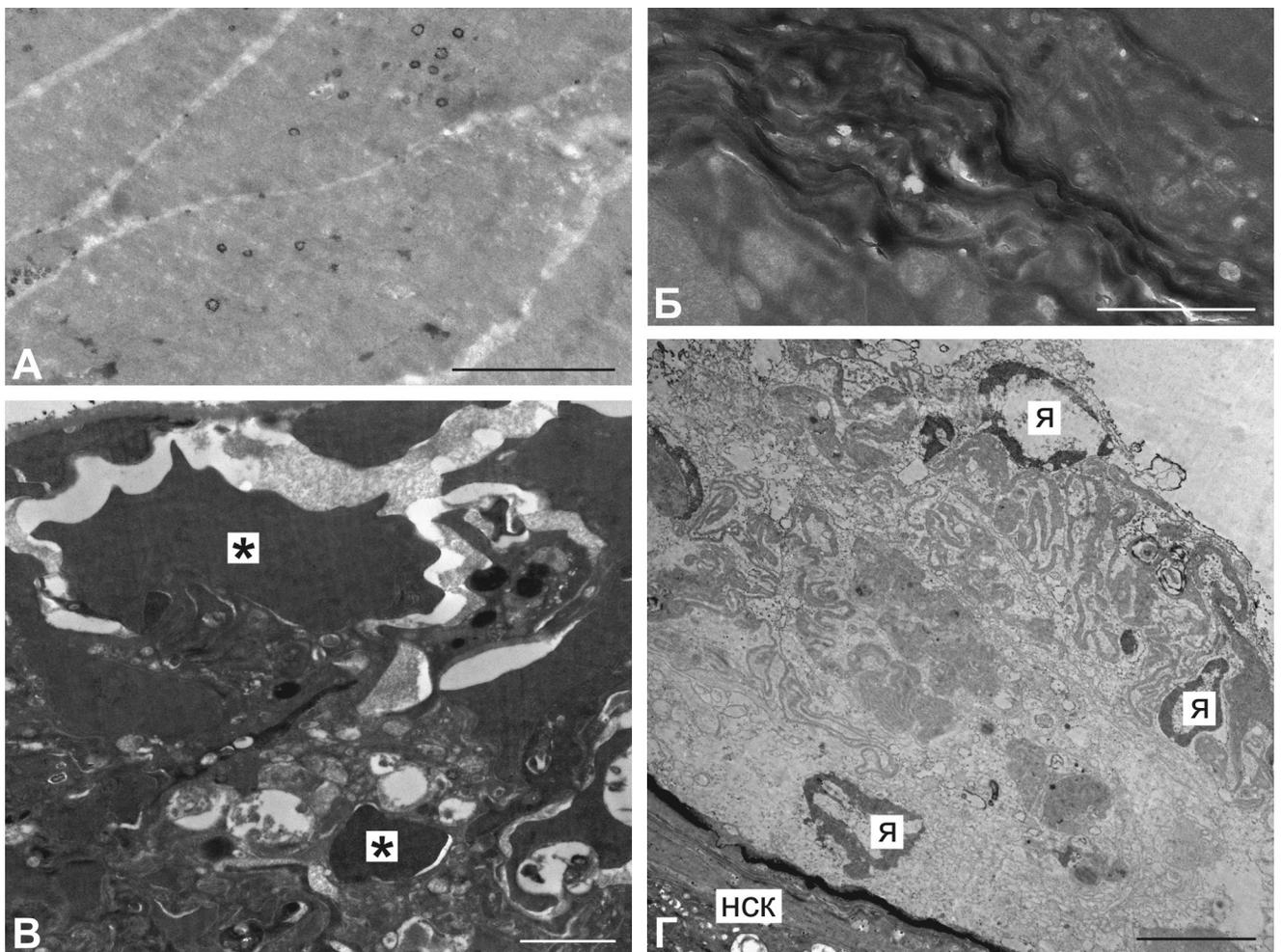


Рис. 3. А. Ультратонкий срез внутреннего слоя капсулы, образованного дегенерировавшим материалом. Б–Г. Ультраструктура наружного слоя капсулы. НСК – наружный слой капсулы, Я – ядра. Звездочками показаны фрагменты клеток. Линейка: А–В – 2 мкм, Г – 5 мкм.

Образование капсулы рассматривается как важнейшая адаптация тканевых паразитов к иммунному ответу хозяина. В отличие от других видов опекоелидных метацеркарий, например, *P. reflexa* [5] и *Allopodocotyle lepomis* [6, 7], капсула которых состоит из нескольких слоев клеток хозяина, метацеркарии *P. atomon* окружены капсулой преимущественно из неклеточного материала. Внутренний слой капсулы образован электронно-светлым тонковолокнистым материалом, а наружный состоит из электронно-плотного вещества, напоминающего меланин, с включением клеток хозяина и/или их фрагментов. Согласно данным Коие [4], метацеркарии *P. atomon* локализуются в мышцах спинной части амфипод и инкапсулируются материалом, образующимся путем дегенерации и трансформации прилегающего к паразиту участка мышечной ткани беспозвоночного. В дальнейшем этот участок мышечной ткани вместе с заключенной внутри личинкой выделяется в гемоцель. Структурные изменения, включая дегенеративные, мышечных клеток беспозвоночных могут вызывать и другие виды паразитов. Например, в мышечных клетках комаров *Aedes aegypti*, пораженных личинками нематод *Brugia pahangi*, ядра и митохондрии увеличиваются в размере, а миофибриллы, прилегающие к паразитам, уплотняются по мере их роста [8]. Личинки этого же вида нематод в комарах *Anopheles quadrimaculatus* окружаются плотным слоем диссоциированной саркоплазмы, включающей большое количество клеточных мембран и везикул [9]. Указываются и более обширные изменения мышечных волокон в виде полного их разрушения, связанного, главным образом, с миграцией зрелых филярий в гемоцель комаров [8]. Отмечается, что ядра и митохондрии дегенерирующих мышечных волокон разрушаются, после чего удаляются макрофагами, а миофибриллы распадаются на фрагменты, которые сливаются и образуют аморфную массу. В составе исследованных нами капсул подокотилей мы не обнаружили структурных компонентов мышечной ткани, поскольку образующий их материал был дегенерирован. В то же время, при сравнении ультратонкого строения разрушенных мышечных волокон насекомых, подвергнутых инвазирующему действию вышеупомянутого вида микрофилярий нематод, и внутреннего слоя капсулы подокотилей мы наблюдали их сходство, заключающееся в общей невысокой электронной плотности и рыхлой организации образующего их вещества. Однако для подтверждения гипотезы о мышечной природе этого слоя необходимы дополнительные экспериментальные исследования с поэтапным изучением гистологических срезов.

Особенностью строения наружного слоя капсулы *P. atomon* является входящее в его состав электронно-плотное вещество, напоминающее меланин. Известно, что меланизация у артропод

является важнейшим защитным механизмом, приводящим к формированию и скоплению меланина на поверхности патогенных организмов. В процессе меланогенеза образуется ряд токсичных соединений, которые в ряде случаев негативно влияют на жизнедеятельность паразитов/паразитоидов [10, 11]. Среди беспозвоночных животных наиболее полно механизмы защиты от различных патогенных организмов изучены у насекомых. Так, в гемоцеле комаров *A. quadrimaculatus* на поверхности микрофилярий нематод *B. pahangi* и *B. malayi* сначала откладывается слой меланина, а затем поверх него начинают оседать гемоциты, образующие несколько слоев [12]. Некоторые из этих нематод имеют признаки деструкции. Аналогичная опосредованная клетками реакция меланизации и последующая инкапсуляция описаны вокруг дегенерированных яиц ос *Asobara tabida* и *Asobara citri* в представителях нескольких видов дрозофил [13], а также вокруг личинок ос *Leptopilina heterotoma*, погибших в *Drosophila suzukii* [14]. Среди ракообразных, в частности, амфипод, меланизированными находили личинок разных видов скребней и трематод [15–17]. Так, в амфиподах *Spinulogammarus ochotensis* цистаканты скребней *Corynosoma strumosum* окружены сплошным ободком темно-коричневого вещества, предположительно меланина, плотно прилегающего к поверхности паразита, при этом личинки в окружении меланотической капсулы были погибшими [17]. В случае меланизации метацеркарий трематод пигмент нередко откладывается на поверхность цисты, которая синтезируется тегументом паразита. К примеру, в амфиподах *Gammarus insensibilis* обнаружено четыре вида микрофаллидных трематод, различающихся разной интенсивностью меланизации, при этом наибольшей пигментации подвержен тот вид, который, по предположению авторов, либо слабо адаптирован к хозяину, либо является наиболее патогенным для последнего [16]. Однако в работе нет указаний о жизнеспособности этих трематод. У исследованных нами подокотилей слой предполагаемого пигмента располагался не на поверхности паразита или окружающей его цисты, а на поверхности внутреннего слоя капсулы, то есть в сущности представлял собой наружный слой капсулы.

Согласно литературным сведениям, полностью меланизированные паразиты погибают не во всех случаях, иными словами, меланизация не всегда приводит к их гибели [18]. Более того, часто находят погибших паразитов без признаков меланизации [19] или пигмент может откладываться позже и на поверхности уже погибших паразитов [20, 21], то есть пигментации подвергается уже погибшая ткань. В последнем случае, в качестве примера, можно привести работу Дэдхад с соавт. [22], в которой в экспериментальных условиях

было показано, что в гемоцеле *Anopheles paraliae* дегенерированные нематоды *B. malayi* обнаруживаются через 3 ч после заражения комаров, а у *Anopheles lesteri* – через 4 ч. Меланизированные особи этих червей у обоих видов комаров наблюдались спустя 1 ч, то есть через 4 и 5 ч после заражения соответственно. Как было показано выше, у исследованных подокотилей внутренний слой капсулы образован разрушенной тканью. Таким образом, можно предполагать, что отложение пигмента на поверхности капсулы подокотилей определенным образом связано с гибелью и дегенерацией материала ее внутреннего слоя.

**Морфология цисты.** Строение цисты у подокотилей из обоих исследованных видов амфипод также оказалось сходным. На свето-микроскопическом уровне циста во всех случаях характеризуется относительно постоянной толщиной (около 8–10 мкм) и интенсивно окрашивается гистологическими красителями (рис. 2). На большем увеличении она представляет собой единый слой однородного, аморфного материала (рис. 1Д). Окружающая капсула иногда плотно прилегает к цисте, но чаще их разделяет «свободное» пространство.

Структура и процесс формирования цисты метацеркарий изучены у большого количества видов трематод, инвазирующих в качестве второго промежуточного хозяина как позвоночных [23],

так и беспозвоночных животных [24, 25]. В зависимости от систематической принадлежности трематод и их хозяев цисты метацеркарий различаются количеством слоев: последние могут варьировать по строению, толщине, химическому составу. У рассматриваемых *P. atomon*, как и у *P. reflexa*, исследованных на гистологическом уровне [5], циста представлена в виде единого, образованного однородным веществом, слоя.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что капсула, окружающая исследованных метацеркарий подокотилей, состоит из двух слоев. При этом наружный слой предположительно пигментирован, тогда как внутренний образован дегенерированной тканью хозяина (возможно, мышечной). Циста исследованных метацеркарий по своему строению не отличается от таковой, описанной у *P. reflexa*. Для уточнения структуры внутреннего слоя капсулы, а также проверки предположения о меланизации наружного слоя капсулы необходимы дальнейшие исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания «Таксономическое, морфологическое и экологическое разнообразие гельминтов позвоночных животных Северной Азии» № ААА-А17-117012710031-6. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орловская О.М. Новые сведения о жизненных циклах некоторых видов трематод прибрежных рыб Северного Охотоморья // Биоразнообразие и экология паразитов. Труды Центра паразитологии. Том XLVI / Под ред. С.В. Зиновьева. М.: Наука, 2010. С. 186–197.
2. Успенская А.В. Паразитофауна бентических ракообразных Баренцева моря. М.: Изд-во акад. наук СССР, 1963. 126 с.
3. James B.L. Host selection and ecology of marine digenean larvae // Fourth European marine biology symposium / Ed. D.J. Crisp. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1971. P. 179–197.
4. Koie M. On the morphology and life history of *Podocotyle reflexa* and a comparison of its developmental stages with those of *P. atomon* (Trematoda, Opencelidae) // Ophelia. 1980. Vol. 20. N 1. P. 17–43.
5. Shimazu T. On two metacercariae on the genus *Podocotyle* from the shrimp, *Pandalus goniurus*, from Aniva Bay, Sakhalin, USSR (Trematoda, Opencelidae) // Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. 1973. Vol. 39. N 5. P. 481–487.
6. Lo S.J., Hall J.E., Allender P.A., Klainer A.S. Scanning electron microscopy of an opencelid cercaria and its encystment and encapsulation in an insect host // J. Parasitol. 1975. Vol. 61. N 3. P. 413–417.
7. Knowles E.E., Hall J.E. Histopathology of an opencelid trematode infection in mayfly Naiads // J. Invert. Pathol. 1976. Vol. 27. N 3. P. 351–362.
8. Beckett E.B. Histological changes in mosquito flight muscle fibres associated with parasitization by filarial larvae // Parasitology. 1971. Vol. 63. N 3. P. 365–372.
9. Chikilian M.L., Bradley T.J., Nayar J.K., Knight J.W. Ultrastructural comparison of extracellular and intracellular encapsulation of *Brugia malayi* in *Anopheles quadrimaculatus* // J. Parasitol. 1994. Vol. 80. N 1. P. 133–140.
10. Глунов В.В., Слепнева И.А., Дубовский И.М. Генерация активированных кислородных метаболитов при формировании иммунного ответа у членистоногих // Труды Зоол. ин-та. РАН. 2009. Т. 313. № 3. С. 297–307.
11. Dubovskiy I.M., Kryukova N.A., Glupov V.V., Ratcliffe N.A. Encapsulation and nodulation in insects // Invert. Surv. J. 2016. Vol. 13. N 1. P. 229–246.
12. Chen C.C. Further evidence of both humoral and cellular encapsulations of sheathed microfilariae of *Brugia pahangi* in *Anopheles quadrimaculatus* // Parasitology. 1988. Vol. 78. N 6. P. 819–826.
13. Nappi A., Poirié M., Carton Y. The role of melanization and cytotoxic by products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps // Adv. Parasitol. 2009. Vol. 70. N 4. P. 99–121.
14. Kim-Jo C., Gatti J-L., Poirié M. *Drosophila* cellular immunity against parasitoid wasps: a complex and time-dependent process // Frontiers Physiol. 2019. Vol. 10: 603.
15. Dezfili B.S., Simoni E., Duclos L., Rossetti E. Crustacean-acanthocephalan interaction and host cell-mediated immunity: parasite encapsulation and melanization // Folia Parasitol. 2008. Vol. 55. N 1. P. 53–59.
16. Kostadinova A., Mavrodiya R.S. Microphallids in *Gammarus insensibilis* Stock, 1966 from a Black Sea Lagoon:

host response to infection // *Parasitology*. 2005. Vol. 131. N 3. P. 347–354.

17. Skorobrekhova E.M., Nikishin V.P. Encapsulation of the acanthocephalan *Corynosoma strumosum* (Rudolphi, 1802) Lühe, 1904, in the intermediate host *Spinulogammarus ochotensis* // *J. Parasitol.* 2019. Vol. 105. N 4. P. 567–570.

18. Christensen B.M., Li J., Chen C.-C., Nappi A.J. Melanization immune responses in mosquito vectors // *Trends Parasitol.* 2005. Vol. 21. N 4. P. 192–199.

19. Carton Y., Frey F., Nappi A.J. Inheritance of cellular immune resistance in *Drosophila melanogaster* // *Heredity*. 1992. Vol. 69. P. 393–399.

20. Salt G. The cellular defense reactions of insects. Cambridge monograph in experimental biology. London: Cambridge Univ. Press, 1970. 118 pp.

21. Kobayashi M., Ogura N., Yamamoto H. Studies on filariasis VIII: histological observation on the abortive development of *Brugia malayi* larvae in the thoracic muscles of the mosquitoes, *Armigeres subalbatus* // *Jpn. J. Sanit. Zool.* 1986. Vol. 37. N 2. P. 127–132.

22. Dedkhad W., Christensen B.M., Bartholomay L.C., Joshi D., Hempolchom C., Saeung A. Immune responses of

*Aedes togoi*, *Anopheles paraliae* and *Anopheles lesteri* against nocturnally subperiodic *Brugia malayi* microfilariae during migration from the midgut to the site of development // *Parasites Vectors*. 2018. Vol. 11: 528.

23. Martin T.R., Conn D.B. The pathogenicity, localization, and cyst structure of echinostomatid metacercariae (Trematoda) infecting the kidneys of the frogs *Rana clamitans* and *Rana pipiens* // *J. Parasitol.* 1990. Vol. 76. N 3. P. 414–419.

24. Taft S.J. Cinephotomicrographic and histochemical observations on cercarial penetration and encystment by *Plagiorchis* sp. in larvae of *Chaoborus* sp. // *Trans. Am. Micros. Soc.* 1990. Vol. 109. N 2. P. 160–167.

25. Galaktionov K.V., Malkova I.I., Irwin S.W.B., Saville D.H., Maguire J.G. The structure and formation of metacercarial cysts in the trematode family Microphallidae Travassos 1920 // *J. Helminthol.* 1997. Vol. 71. N 1. P. 13–20.

Поступила в редакцию 07.06.2020 г.

После доработки 28.09.2020 г.

Принята в печать 07.10.2020 г.

## SHORT COMMUNICATION

# Structure of the envelopes that are formed around metacercariae of the trematode *Podocotyle atomon* (Rudolphi, 1802) in its second intermediate host

Е.М. Skorobrekhova 

*Institute of Biological Problems of the North, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Portovaya str., 18, Magadan, 685000, Russia*

We assessed the structure of *Podocotyle atomon* metacercariae cysts and their surrounding capsules in the trematode's second intermediate hosts – *Locustogammarus locustoides* (Brandt, 1851) and *Spinulogammarus ochotensis* (Brandt, 1851) – using light and transmission electron microscopy. The cysts, which are synthesized from materials secreted by the parasite tegument, exhibited a single, amorphous layer. The capsules formed by the host consisted of two layers: an electron-light, loose inner layer and an electron-dark, unstructured outer layer, which incorporated a small amount of intact and fragmented host cells. The inner capsule layer may have been formed by degeneration and transformation of the amphipod's muscle tissue that surrounds the larva. The outer layer of the capsule appeared to contain pigment deposits.

**Keywords:** *ultrastructure, amphipods, metacercariae, cyst, capsule, Podocotyle atomon*

### Сведения об авторе

Скоробрехова Екатерина Михайловна – науч. сотр. лаборатории экологии гельминтов Института биологических проблем Севера ДВО РАН. Тел.: 8-4132-634-463 e-mail: skorobrekhova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9497-584X>