

УДК 576.8 + 595.121.5 + 595.133

В.П. НИКИШИН

Электронная микроскопия в исследованиях магаданских паразитологов: становление, основные успехи и новые задачи

Кратко рассмотрены основные этапы развития, цели и задачи электронно-микроскопических исследований паразитологов Института биологических проблем Севера ДВО РАН, а также наиболее важные результаты.

Ключевые слова: электронная микроскопия, цестоды, скребни.

Electron microscopy in the studies of Magadan parasitologists: formation, main achievements and new tasks.
V.P. NIKISHIN (Institute of Biological Problems of the North, FEB RAS, Magadan).

The main stages of development, goals and tasks of electron microscopic studies by parasitologists of the Institute of Biological Problems of the North, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences, as well as the most important results are briefly reviewed.

Key words: electron microscopy, cestodes, thorn-headed worms.

Становление и совершенствование электронной микроскопии являет собой яркий пример стремительного развития перспективного метода исследований, на основе которого в считанные десятилетия разработано несколько новых методик. Наиболее актуальные из них – трансмиссионная (просвечивающая) и растровая (сканирующая) электронная микроскопия.

Формирование Института биологических проблем Севера пришлось на начальный период «эры электронной микроскопии». Неудивительно поэтому, что директор-организатор ИБПС, инициатор и руководитель паразитологических исследований чл.-корр. АН СССР Витаутас Леонович Контримавичус не мог не заинтересоваться этим методом, тем более что именно трансмиссионная электронная микроскопия уже в самом начале ее применения совершила настоящую революцию в наших представлениях о морфологии паразитических червей (гельминтов). Дело в том, что эти животные, обитая в агрессивной среде организма хозяина, вынуждены защищаться от его негативного ответа, и защитные механизмы, естественно, в первую очередь приурочиваются к их покровам и оболочкам. Кроме того, интерес к гельминтам усиливался в связи с отсутствием у них многих систем органов, имеющих у свободноживущих организмов, и функции этих органов обычно принимают на себя другие органы и ткани, зачастую также покровные.

Своеобразие строения покровов червей было замечено учеными давно, но только электронная микроскопия позволила открыть и изучить уникальные особенности их

НИКИШИН Владимир Павлович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник (Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан). E-mail: nikishin@ibpn.ru

Исследования поддержаны РФФИ (проект № 15-04-01418) и Президиумом ДВО РАН (проект № 15-I-6-015 о).

организации. Создаваемое в ИБПС направление как раз и было нацелено на изучение этих особенностей. Другой задачей, поставленной Контримавичусом, был поиск тонких морфологических отличий, которые позволили бы разделять виды-двойники. Однако на примере исследованных в Институте гельминтов эта задача оказалась невыполнимой, что, вероятно, объясняется большей консервативностью строения клеток по сравнению с макроорганизацией органов, чьи характеристики более или менее легко определяются с помощью световой микроскопии и потому используются в качестве диагностических признаков. Впрочем, трудности в поиске ультратонких различий между видами могут объясняться малым количеством исследованных видов и тем, что школы использовали разные методики подготовки препаратов.

Таким образом, первой задачей электронно-микроскопической паразитологии в ИБПС стало изучение тонкого строения покровов и защитных оболочек (цист, эмбриональных оболочек яиц и др.) гельминтов. В качестве первых объектов исследований использовались ленточные черви (цестоды). «Сужение» спектра объектов до одного класса, точнее даже не класса, а отряда *Cyclorhynchida*, объясняется, во-первых, наличием в институте высококлассных цестодологов – специалистов именно по этому отряду, которые могли оперативно определять найденных цестод, сохраняя их в живом состоянии, что имеет важнейшее значение для ультратонких исследований. А во-вторых, поскольку одним из направлений лаборатории было экспериментальное изучение жизненных циклов циклофиллид, появлялась возможность сбора уникального материала для изучения гистогенеза покровов цестод. Первичный материал для этих исследований собирали на хорошо оборудованном стационаре «Усть-Чаун» (западная Чукотка), созданном по инициативе В.Л. Контримавичуса в начале 1970-х. Немаловажно и то, что эта группа цестод была обойдена вниманием «электронщиков», хотя является одной из самых многочисленных по количеству видов и включает паразитов человека и хозяйственно важных животных.

Собственно гельминтологические исследования с использованием электронного микроскопа начались в ИБПС в 1974 г. под руководством к.м.н. Г.П. Краснощекова. К этому времени институт располагал отечественным трансмиссионным прибором УЭМБ-100К и ультрамикротомом УМТП-2, настольным сканирующим микроскопом фирмы Hitachi, чуть позднее – чешским ультрамикротомом Tesla. В конце 1970-х институт получил еще два микроскопа фирмы Tesla: настольную модель BS-480 и оказавшийся наиболее



У нового микроскопа перед первым сеансом. Сотрудники лаборатории экологии гельминтов м.н.с. Ксения Кусенко (сидит) и к.б.н. Екатерина Скоробрехова



Студентка 4-го курса Северо-Восточного государственного университета Татьяна Степанова на новом ультрамикротоме готовит срезы для изучения их с помощью электронного микроскопа в рамках подготовки дипломной работы «Гистология и ультраструктура ювенильного скребня *Corynosoma strumosum* из паратенического хозяина»

востребованным и «продуктивным» BS-500, а к 1984 г. – отечественный ЭМБ-100БР. Кроме того, в те же годы были получены более совершенные ультрамикротомы ЛКВ-III и ЛКВ-V (Швеция).

Напомним, что объектами первых тонкоструктурных исследований были цестоды-циклофиллидеи. Для них характерен относительно простой диксенный жизненный цикл, но с поразительно широким разнообразием, иногда даже в рамках одного рода, «личиночных» форм (точнее, метацестод), развивающихся в промежуточных хозяевах. Такое разнообразие не могло не оказаться в центре внимания первых работ, результатом которых стало представление о тонкой организации цистицеркоидов ряда модификаций (подотряд *Hymenolepidata*), развивающихся в беспозвоночных, и цистицерков (подотряд *Taeniata*), развивающихся в млекопитающих. И те и другие состоят из сколекса с шейкой, из которых в дальнейшем развивается взрослая цестода, и цисты с хвостовым придатком (личиночного органа по Г.П. Краснощекову), отбрасываемых при попадании в окончательного хозяина. Именно макроскопическими особенностями организации личиночного органа определяется та или иная модификация метацестоды, но клеточное и субклеточное строение всех отделов можно было изучить только с применением электронного микроскопа. В частности, было установлено, что эпителий каждого отдела цистицеркоида при общей схеме синцитиальной организации имеет свои уникальные особенности строения, связанные со специфическими функциями. Различия проявляются также между разными модификациями цистицеркоидов, а иногда и между видами (попытки решения второй задачи, о которой говорилось выше). Отметим, что столь планомерное изучение метацестод циклофиллидей до сих пор не имеет аналогов в мире по количеству охваченных видов и форм. Итогом этой работы стала докторская диссертация Г.П. Краснощекова [2], в которой он разработал теорию самостоятельной эволюции личиночного органа, объясняющую возникновение всего многообразия метацестод циклофиллидей. Эти исследования продолжаются до сих пор, охватывая новые модификации метацестод и новые виды.

Однако первые электронно-микроскопические исследования не ограничивались метацестодами. Естественный интерес вызывало тонкое строение тканей гименолепидат, контактирующих со стенкой кишечника окончательного хозяина. Оказалось, что каждый эпителий их сколексов характеризуется признаками, обусловленными особенностями экологии гельминтов и, как следствие, развитостью их органов фиксации (присосок

и хоботка, вооруженного крючьями), а также организацией железистого аппарата. Определенные различия, выявленные в строении эмбриональных оболочек этих гельминтов и самих эмбрионов (онкосфер), вероятно, также обусловлены особенностями экологии червей, точнее физиологией их промежуточных хозяев (как правило, это один или малое количество видов беспозвоночных), в которых из проглоченных ими яиц цестод развиваются цистицеркоиды.

В 1975 г. с приходом в лабораторию к.б.н. Д.Т. Плужникова, специалиста по нейроморфологии рыб, активизировались исследования нервной системы цестод. Актуальны были, во-первых, тонкая организация нейронов, количество модификаций которых варьирует у разных видов, и, во-вторых, структура рецепторов, имеющих на поверхности гельминта. Последний аспект особенно интересен в плане изучения взаимоотношений паразита и хозяина, поскольку в пуле нервных окончаний было обнаружено 14 (!) их модификаций [3].

Было бы преувеличением считать эти исследования полностью пионерными. Исследования цестод на разных фазах их жизненного цикла проводились (и проводятся) в ряде лабораторий мира, однако планомерное изучение тонкой организации той или иной их группы на всех стадиях развития осуществлялось только в двух академических институтах – ИБВВ (низшие цестоды) и ИБПС (высшие). Эти работы продолжаются и сейчас, однако их задачи расширились, а в круг объектов исследований добавлены акантоцефалы (скребни). Изучение этого типа, едва ли не самого загадочного среди гельминтов, оказалось щедрым на удивительные находки. Удивляло все – и уникальность ультраструктуры симпластического (в отличие от синцитиального у плоских паразитических червей) кожного эпителия, и тонкое строение эмбриональных личинок, у которых впервые для типа были описаны «железа проникновения» и явление диминуции хроматина [13], ранее известное среди гельминтов только у нематод, и морфофункциональные особенности клеток кожной мускулатуры, выполняющих одновременно с сократительной и опорную функцию, обычно свойственную соединительной ткани, и полное отсутствие соединительной ткани (в привычном для нас понимании), и уникальный механизм секреции



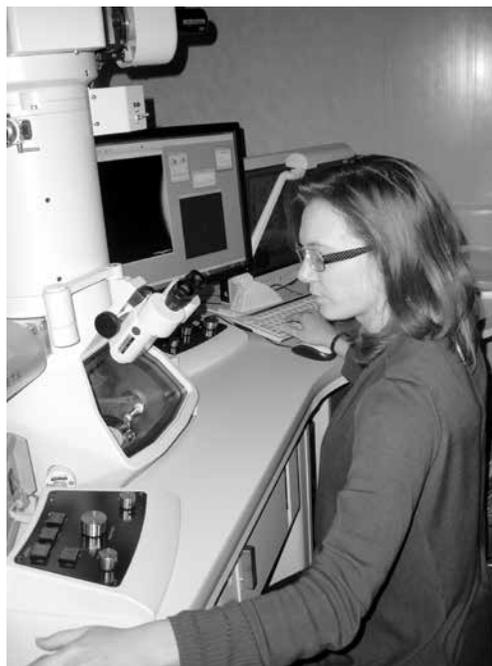
После завершения установки нового оборудования. Слева направо: к.б.н. Екатерина Скоробрехова, д.б.н. Владимир Никишин, м.н.с. Ксения Кусенко, инженер-наладчик ультрамикротомы Гаррет Морган (Великобритания)

материала цисты в процессе развития цистаканта в промежуточном хозяине [12], и еще очень и очень многое... Электронная микроскопия, как впоследствии молекулярная биология, подтвердила гипотезу о сходстве скребней и коловраток, высказанную ранее на основании светомикроскопических данных.

Расширение круга объектов исследования и сравнительный анализ полученных результатов неизбежно привели к постановке двух новых задач исследований. Первая, сугубо паразитологическая, – изучение морфологии взаимоотношений гельминтов с хозяевами разных категорий. Дело в том, что большинство паразитических червей обладают сложными жизненными циклами со сменой хозяев, которые физиологически обычно существенно различаются между собой (например, беспозвоночный промежуточный хозяин и позвоночный окончательный) и к которым паразит должен быть адаптирован, т.е. уметь защищаться от негативного ответа обоих. Эта сложнейшая многоплановая проблема решается на разных уровнях и разными методами, и электронная микроскопия занимает здесь одно из первых мест. Вторая задача, более общая, – изучение тканевой организации паразитических червей и в целом низших многоклеточных животных. Удивительно, но о строении высокоорганизованных животных мы знаем больше, чем об организации низших многоклеточных. Показательным примером важности проблемы является отсутствие приемлемого определения тканей у низших животных [1]. Обе эти задачи логично вытекают из первоначальной, озвученной выше, и остаются актуальными по сей день.

Достигнув своей кульминации к концу 1980-х, интенсивность инструментальных тонких исследований в ИБПС столь же быстро стала сходить «на нет» ввиду невозможности поддержания или замены оборудования из-за отсутствия должного финансирования. Тем не менее, продолжались обработка и осмысление полученных результатов. Кроме того, по мере совершенствования системы поддержки науки с помощью грантов практиковались командировки специалистов в центры коллективного пользования оборудованием в ИБМ ДВО РАН и ИБВВ РАН. Среди важнейших результатов этого периода – второго этапа развития электронной микроскопии в ИБПС – следует отметить детальное исследование морфофункциональной организации сколекса у большой группы видов цестод семейств *Dilepididae* и *Hymenolepididae* [9], а также структуры и гистогенеза защитных оболочек у цистицеркоидов ряда видов этих же семейств, экспериментальное доказательство защитной роли экзоцисты цистицеркоидов в отражении «гемоцитной атаки» организма промежуточного хозяина [7], обобщение сведений о морфологии скребней на разных фазах их жизненного цикла [6] и др.

Отдельно остановимся на результатах исследования взаимоотношений скребня *Corynosoma strumosum* с паразитическими хозяевами в природе и эксперименте [11]. Это исследование, не имеющее аналогов в мировой науке, показало, что характер инкапсуляции коринозома в паразитических хозяевах зависит от их видовой принадлежности и образующая капсула может быть либо лейкоцитарной (воспалительной), либо фибробластической, либо промежуточной. Но главным сюрпризом стало



Магистрант Северо-Восточного государственного университета старший лаборант Татьяна Давыденко изучает ультраструктуру скребня *Acanthocephalus tenuirostris*

открытие на поверхности этих скребней мощного слоя гликокаликса, сходного с формируемым у цистакантов в промежуточном хозяине. Такой гликокаликс обнаружен у коринозом из большинства исследованных паратенических хозяев. Интрига заключается в том, что промежуточными хозяевами коринозом являются рачки-гаммарусы, а паратеническими – морские рыбы. В то же время у коринозом из камбаловых рыб (естественных хозяев) и из экспериментально инвазированных аквариумных рыб, земноводных и пресмыкающихся (не естественных хозяев), а также у скребня *Sphaerostris picae* из естественного паратенического хозяина (ящерицы) такой гликокаликс не обнаружен. Эти результаты предполагают наличие у скребней как минимум двух стратегий защиты от негативного ответа паратенического хозяина и, соответственно, двух форм взаимоотношений этих животных [5].

В 2014 г. начался третий этап развития электронно-микроскопических исследований паразитологов ИБПС. По инициативе предыдущего директора, чл.-корр. РАН И.А. Черешнева, и при принципиальной поддержке и финансовом обеспечении со стороны президиума ДВО РАН институт получил (между прочим, первым в России!) современный комплекс электронно-микроскопического оборудования, включающий микроскоп JEM 1400 PLUS (JEOL, Япония) и ультрамикротом РТ-РС (Boeckeler Instruments, Inc., США). Не менее (а может быть, и более) важным условием развития научных исследований стали молодые, но уже хорошо владеющие методикой электронной микроскопии сотрудники, пришедшие в лабораторию экологии гельминтов в последние годы. Теперь для продуктивного научного творчества было все: и современное оборудование, и хорошо отработанная применительно к паразитическим червям методика, и весомый багаж результатов предыдущих исследований, и четко сформулированные и актуальные задачи, и молодые амбициозные (в лучшем смысле этого слова) сотрудники. И результаты не заставили себя ждать. Одним из первых исследований, выполненных с использованием новой техники, стало изучение ультраструктуры лигамента скребней. Вообще термин «лигамент» широко используется в биологии и медицине в разных смыслах, но у скребней им обозначается «мешок», в котором располагаются внутренние органы. Издавна считается, что он представляет собой атавизм и ранее у свободноживущих предков современных скребней был кишечником. Однако электронная микроскопия показала, что стенка лигамента образована своеобразной мышечной тканью (вероятно, симпластом), в которой сократительные элементы занимают лишь меньшую часть цитоплазмы, и какие-либо признаки иной ткани, в частности эпителия, отсутствуют [4]. Другой работой стало исследование с помощью электронной микроскопии взаимоотношений скребня *C. strumosum* с бельдюгой и палтусом, позволившее предположить, что при сходстве ответной воспалительной реакции этих рыб на инвазию паразит лучше адаптирован к бельдюге, чем к палтусу [10].

В короткой статье невозможно отразить все результаты и планы, все мечты и надежды, связанные с электронной микроскопией – удивительным, неповторимо красивым, трудным и одновременно благодарным методом научных исследований, без которого невозможно представить современную биологию. Закончить статью хочется словами, написанными полтора десятка лет назад [8]: «На моем рабочем столе стоит “сердце” одного из первых магаданских электронных микроскопов УЭМВ-100К – катодный узел... Так хочется надеяться, что когда-нибудь подобное ему “сердце”, пусть другой машины, станет теплым, и рожденный им тонкий электронный лучик перед восхищенными глазами ученого нарисует на флюоресцирующем экране новую картину непознанной жизни». Мечты сбываются!

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов И.И., Дунаев П.В., Бажанов А.Н. Филогенетические основы тканевой организации животных. Новосибирск: Наука, 1986. 238 с.
2. Краснощеков Г.П. Лярвогенез и морфологическая изменчивость тегумент личинок высших цестод: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1982. 43 с.

3. Краснощекоев Г.П., Плужников Л.Т., Поспехов В.В. Морфофункциональные особенности нервной системы циклофиллидей // Изв. ТИНРО. 1994. Т. 117. С. 7–25.
4. Кусенко К.В., Никишин В.П. Тканевая организация лигамента скребня *Neoechinorhynchus beringianus* Mikhailova et Atrashkevich, 2008 (Acanthocephala, Eoacanthocephala) // Биология внутренних вод. 2017. № 2. С. 25–295.
5. Никишин В.П., Скоробрехова Е.М. Стратегии взаимоотношений скребней с паратеническими хозяевами // Современные проблемы теоретической и морской паразитологии: сб. науч. ст. / под ред. К.В. Галактионова, А.В. Гаевской. Севастополь, 2016. С. 102–105.
6. Никишин В.П. Цитоморфология скребней. М.: ГЕОС, 2004. 234 с.
7. Никишин В.П., Лебедев Д.В. Экспериментальное доказательство защитной роли экзосцисты у метастестод *Microsomacanthus lari* // Биология моря. 2011. Т. 37, № 1. С. 71–74.
8. Никишин В.П. Электронная микроскопия в исследованиях магаданских биологов // Колымские вести. 2002. № 16. С. 57–58.
9. Поспехова Н.А. Морфо-функциональные особенности сколекса циклофиллидей: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2001. 23 с.
10. Скоробрехова Е.М., Никишин В.П. Морфологические особенности скребня *Corynosoma strumosum* (Polymorphidae) в паратенических хозяевах бельдюге *Zoarces elongatus* (Kner, 1868) (Zoarcidae) и палтусе *Hippoglossus stenolepis* (Schmidt, 1904) (Pleuronectidae) // Биология моря. 2017. № 1. С. 39–46.
11. Скоробрехова Е.М. Морфология взаимоотношений скребня *Corynosoma strumosum* (Acanthocephales: Polymorphidae) и паратенических хозяев в природе и эксперименте: автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 2014. 22 с.
12. Nikishin V.P. Formation of the capsule around *Filicollis anatis* (Acanthocephala) in its intermediate host // J. Parasitol. 1992. Vol. 78, N 1. P. 127–137.
13. Nikishin V.P. Ultrastructure of the eggs of *Polymorphus magnus* (Acanthocephala, Polymorphidae) // Parasite. 2004. Vol. 11, N 1. P. 33–42.