

УДК 576.89:595.122.2;591.473.2;591.86

<https://doi.org/10.31016/978-5-6053355-1-1.2025.26.250-254>

**ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ И ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ КРОВЯНОГО СОСАЛЬЩИКА,
ПАРАЗИТА ПРЭСНОВОДНЫХ РЫБ, *SANGUINICOLA
PLEHNAE* (DIGENEA, SANGUINICOLIDAE)**

Поддубная Л. Г.¹,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

Крещенко Н. Д.²,

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
nkreshch@rambler.ru

Теренина Н. Б.³,

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник

Аннотация

С помощью гистохимического окрашивания, конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии исследовали морфологию паразита щуки, *Sanguinicola plehnae*. Окрашивание флуоресцентно-меченым фаллоидином показало наличие мышечных слоев, идущих в круговом и продольном направлениях. Диагональные мышечные волокна расположены между слоями кольцевых и продольных волокон. Передний конец тела червя имеет миниатюрный вентральный рот и связанную с ним вентральную глотку, присоски отсутствуют. Продольные мышечные волокна тянутся вдоль границы пищевода. Короткий X-образный слепой кишечник *S. plehnae* окружен интенсивно окрашенными мышечными волокнами. Мускулатура выявлена вокруг дольчатого семенника, а также вокруг цирруса, окруженного большой зоной модифицированных пластинчатых саркоплазматических отростков с мышечными волокнами в их расширенных

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина Российской академии наук (152742, Россия, Ярославская обл., пос. Борок, д. 109)

² Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (142290, Россия, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3)

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук (119071, Россия, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 33)

частях, выявленных с помощью электронной микроскопии. Вдоль боковых краев тела *S. plehnae* выявлен ряд глубоко укоренившихся шипов, хорошо различимых как при электронной микроскопии, так и при окрашивании фаллоидином. Эти данные свидетельствуют о происхождении шипов с участием актиновых мышечных филаментов. Результаты подтверждают важную роль мышечной системы дигеней в функционировании пищеварительных и репродуктивных органов.

Ключевые слова: дигенеи, электронная микроскопия, мускулатура, фаллоидин

ELECTRONIC MICROSCOPY AND HISTOCHEMICAL STUDY OF THE BLOOD FLUKE *SANGUINICOLA PLEHNAE* (DIGENEA, SANGUINICOLIDAE), A PARASITE OF FRESHWATER FISHES

Poddubnaya L. G. ¹,

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher

Kreshchenko N. D. ²,

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher,
nkreshch@rambler.ru

Terenina N. B. ³,

Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher

Abstract

Morphology of pike parasite *Sanguinicola plehnae* was studied by histochemical staining, confocal laser scanning microscopy, transmission electron microscopy, and scanning electron microscopy. The staining with fluorescently labeled phalloidin showed muscle layers running in circular and longitudinal directions. Diagonal muscle fibers are located between layers of circulars and longitudinal fibers. The anterior end of the fluke has a miniature ventral mouth and a ventral pharynx; suckers are absent. Longitudinal muscle fibers extend along the esophagus. The short X-shaped caecum of *S. plehnae* is surrounded by intensely stained muscle fibers. The musculature is found around the lobular testis and around the cirrus surrounded by a large zone of modified lamellar sarcoplasmic appendages with muscle fibers in

¹ Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences (109, settlement of Borok, Yaroslavl Region, 152742, Russia)

² Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences (3, Institutskaya st., Pushchino, 142290, Russia)

³ Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, (33, Leninsky pr., Moscow, 119071, Russia)

their expanded portions that are revealed by electron microscopy. Along the lateral edges of *S. plehnae* a number of deeply rooted spines are found that are visible both by electron microscopy and phalloidin staining. These data indicate that the origin of the spines involves actin muscle filaments. The results confirm the important role the muscular system of digeneans play in the functioning of the digestive and reproductive organs.

Keywords: digeneans, electron microscopy, musculature, phalloidin

Введение. Кровяные сосальщики, сангвиниколиды, поражают сосудистую систему морских и пресноводных костистых рыб. Заболевание сангвиниколиоз вызывает массовую гибель рыб, выращиваемых в прудах и садках в Северной Америке, Европе и Азии. Эта группа сосальщиков включает 5 семейств, характеризующихся значительным морфологическим разнообразием (Warren, et al. 2023). Для кровяных сосальщиков рода *Sanguinicola* характерны миниатюрные размеры листовидного, плоского, прозрачного тела (1–3 мм) с ротовым отверстием и небольшой глоткой, короткими ветвями кишечника, расположенных в передней части тела, одним рядом погруженных шипов вдоль боковых краев тела, сближенными мужским и женским половым отверстием на дорзальной стороне заднего отдела тела. Данные о морфологии кровяных сосальщиков крайне ограничены. В настоящей работе представлены результаты электронно-микроскопического и гистохимического исследования *Sanguinicola plehnae* (Sanguinicolidae), паразита щуки.

Материалы и методы. Взрослых червей *S. plehnae* (5 экземпляров) собирали из сердца щуки (*Esox lucius*; Верхняя Волга, Россия). Червей фиксировали в 4% параформальдегиде 12 часов. Образцы помещали в буфер PBS с 10% сахарозой при 4°C. Мускулатуру окрашивали фаллоидином, меченым тетраметилродамином В изотиоцианатом (TRITC) в разведении 1:200 в течение 6 часов. Препараты монтировали в PBS/глицерин и исследовали под конфокальным лазерным сканирующим микроскопом Leica TCS SP5 (Германия). Измерения проводились на микроскопических изображениях, полученных из фиксированных препаратов.

Для электронной микроскопии 9 червей фиксировали 3% глутаральдегидом 20 дней при 4°C, промывали и постфиксировали в 1% четырехоксиде осмия 1 час. Образцы дегидратировали в серии этанола. Для СЭМ три образца были высушены в критической точке на сушилке NCP-2 (Hitachi, Япония), закреплены на заглушках, покрыты золотом-палладием с помощью FC 1600 Auto Fine Coater (JEOL Ltd., Япония) и исследованы с помощью микроскопа JEOL-JEM-6510LV при 15 кВ. Для ПЭМ шесть образцов были залиты в смесь Araldit и Epon с использованием Embedding Kit (Sigma Aldrich, Аргентина). Ультратонкие срезы (толщиной 50–90 нм) готовили на ультрамикротоме Leica MZ6 (Германия), закреплены на медных пластинах с формваровым покрытием и окрашены в уранилацетате и цитрате свинца пе-

ред исследованием с помощью электронного микроскопа LOEL JEM-1011 (JOEL, Япония) при 80 кВ.

Результаты исследований. Внешняя поверхность тела (тегументальная цитоплазма) *S. plehnae* выстлана двумя мышечными слоями, идущими в круговом и продольном направлениях. Продольные волокна, шириной около 3 мкм в ряде случаев расположены попарно. Паттерн отчетливо различим в средней части тела. Наблюдаются сильно развитые диагональные мышечные волокна, расположенные вдоль оси тела, между слоями кольцевых и продольных волокон. Диагональные мышечные волокна прикреплены к базальной пластинке под дистальной тегументальной цитоплазмой с помощью гемидесмосом. Расстояние между диагональными мышечными волокнами равно примерно 17–25 мкм. Передний конец тела имеет вентральный рот и связанную с ним глотку. Окрашивание TRITC-фаллоидином выявило продольные мышечные волокна, тянущиеся вдоль границы пищевода. Вдоль боковых краев тела выявлен ряд глубоко укоренившихся шипов, хорошо различимых как при электронной микроскопии, так и при окрашивании фаллоидином. Короткий X-образный слепой кишечник окружен мышечными волокнами. Гистохимическая окраска выявила контуры дольчатого семенника неправильной формы. Обнаружены многочисленные, удлиненные, плотно упакованные в два ряда доли семенника, вокруг каждой доли видно диффузное расположение мышечных волокон. Расположенные на заднем конце циррус и семяизвергающий проток окружены регулярными кольцевыми мышечными волокнами. Трансмиссионная электронная микроскопия показала, что циррус окружен модифицированными саркоплазматическими отростками в виде пластинчатых выростов с мышечными волокнами в их расширенных частях.

Заключение. У *S. plehnae* тегументальные шипы распределяются в виде продольного ряда вдоль латеральных краев тела, локализуется глубоко. Шипы пресноводных и морских кровяных сосальщиков отличаются от шипов других дигеней (Poddubnaya et al., 2020). Большая часть тела шипа окружена саркоплазматическим отростком, заполненным миофиламентами. Предполагают, что шипы сангвиниколид и апорокотилид могут содержать фибриллярный актин, окрашиваясь фаллоидином, что отличает их от тегументальных шипов других дигеней (Poddubnaya et al., 2019, 2021). Интенсивное окрашивание шипов фаллоидином у *S. plehnae*, выявленное в настоящей работе, подтверждает высказанное ранее мнение о происхождении шипов с участием актиновых филаментов. Результаты будут полезны для проведения сравнительного анализа мышечной системы у представителей различных таксономических групп, имеющих различных хозяев и локализацию в них.

Список источников / References

1. Poddubnaya L. G., Hemmingsen W., Poddubny S. A., Gibson D. I. Unique ultrastructural characteristics of the tegument of the digenean blood fluke *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Digenea: Aporocotylidae), a parasite of flatfishes. *Parasitology Research*. 2019; 118: 2801–2810.
2. Poddubnaya L. G., Zhokhov A. E., Gibson D. I. Ultrastructural features of aporocotylid blood flukes: the tegument and sensory receptors of *Sanguinicola inermis* Plehn, 1905 from the pike *Esox lucius*, with a comparative analysis of their traits within the Neodermata. *Zoologischer Anzeiger*. 2020; 289: 108–117.
3. Poddubnaya L. G., Zhokhov A. E., Hemmingsen W., Gibson D. I. Ultrastructural evidence for the participation of muscle cells in the formation of extracellular matrices in aporocotylid blood flukes. *Zoologischer Anzeiger*. 2021; 293: 101–111.
4. Warren M. B., Poddubnaya L. G., Zhokhov A. E., Reyda F. B., Choudhury A., Bullard S. A. Revision of *Sanguinicola* Plehn, 1905 with redescription of *Sanguinicola volgensis* (Rašin, 1929) Mcintosh, 1934, description of a new species, proposal of a new genus, and phylogenetic analysis. *The Journal of parasitology*. 2023; 109: 296–321.