

На правах рукописи

АФАНАСЬЕВ-ГРИГОРЬЕВ Алексей Григорьевич

**ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
МУЖСКОЙ ПОЛОВОЙ СИСТЕМЫ И СПЕРМАТОГЕНЕЗА
СВОБОДНОЖИВУЩИХ МОРСКИХ НЕМАТОД
ИЗ ОТРЯДА ENOPLIDA (NEMATODA, ENOPLEA)**

03.03.05 – биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2011

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН
Юшин Владимир Владимирович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, ст.н.с.
Долматов Игорь Юрьевич

доктор биологических наук, профессор
Чесунов Алексей Валериевич

Ведущая организация Учреждение Российской академии наук Институт
биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Защита состоится 27 декабря 2011 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д005.008.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН по адресу:

690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17. Телефон: (423) 2310905, факс (423) 310900, электронный адрес: inmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

Отзывы просим присылать на электронный адрес: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан “_____” ноября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Нематоды – одна из самых многочисленных и широко распространенных групп многоклеточных животных, освоивших гигантский диапазон сред обитания и находящихся на стадии активного биологического прогресса (Парамонов, 1962; Малахов, 1986; Чесунов, 2006). Причина этого прогресса заключается, в том числе, в особенностях строения тканей, клеток, а также в биологии размножения нематод. Исследование ультраструктуры нематод с помощью трансмиссионных электронных микроскопов начались в 50-х годах прошлого столетия, и уже тогда предметом исследования стали в основном нематоды – паразиты растений и животных, играющих важную роль в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве. Позднее такая почвенная нематода, как *Caenorhabditis elegans*, стала модельным объектом, с помощью которого были исследованы и продолжают в настоящее время исследоваться ключевые вопросы генетики, клеточных дифференцировок, механизмов старения и другие вопросы биологии развития.

В настоящее время существует дисбаланс в данных по гистологии и цитологии нематод, так как свободноживущие морские нематоды, составляющие бóльшую часть разнообразия класса и играющие колоссальную роль в морских экосистемах, изучались лишь эпизодически (Малахов, 1986; Bird, Bird, 1991; Wright, 1991; Lee, 2002). В то же время, свободноживущие морские нематоды включают таксоны, сохранившие большое число плезиоморфных признаков, анализ которых дает богатый материал для решения вопросов сравнительной эмбриологии, цитологии и гистологии (Малахов, 1986). К таким таксонам относятся прежде всего эноплиды (отряд Enoplida), которые, по мнению некоторых авторов, сохраняют ряд первичных черт класса нематод (Maggenti, 1963; Платонова, 1976; Малахов, 1986).

Ультраструктуру мужской половой системы нематод до сих пор изучали только на примере нескольких видов – паразитов животных и растений, есть также данные по *C. elegans* (Anya, 1966; Hulinska, 1973; Frantz, 1982; White, 1988; Takahashi *et al.*, 1994). Для свободноживущих морских нематод долгое время уникальными оставались данные по традиционной гистологии мужской половой

системы эноплиды *Deontostoma californicum* (Hope, 1974), но в недавно вышедшей работе Зограф (Zograf, 2010) впервые детально рассмотрена ультраструктура мужской половой системы на примере представителя отряда Chromadorida, *Paracyatholaimus pugettensis*. Ограниченность данных по морским свободноживущим нематодам потребовала нового детального исследования мужской половой системы на примере нематод-эноплид для первого сравнительного анализа гистологии мужской половой системы нематод.

По имеющимся в настоящее время данным, сперматогенез эноплид демонстрирует большое разнообразие от семейства к семейству (Wright *et al.*, 1973; Vaccetti *et al.*, 1983; Yushin, Malakhov, 1994; Turpeenniemi, 1998; Yushin, Malakhov, 1998; Yushin, Malakhov, 1999; Justine, Jamieson, 1999; Justine, 2002; Yushin *et al.*, 2002; Yushin, 2003), чего обычно не наблюдается у других нематод. Поэтому второй частью данной работы было ультраструктурное исследование сперматогенеза представителей ранее неизученных семейств эноплид. Особое внимание при этом уделялось судьбе ядерной оболочки в мейозе, а также процессам формирования специфических для сперматозоидов нематод мембранных органелл (МО) и волокнистых тел (ВТ). Исследования сперматозоидов нематод дают не только общебиологическую информацию по основным принципам строения и биологии гамет, обеспечивающих внутреннее оплодотворение, но могут быть использованы и для филогенетического анализа.

Цели и задачи работы. Основной целью настоящей работы было исследование ультраструктуры мужской половой системы и сперматогенеза свободноживущих морских нематод-эноплид. На основе оригинальных и литературных данных предполагалось провести сравнительно-цитологический анализ строения мужской половой системы и развития сперматозоидов нематод-эноплид.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи.

1. Изучить строение дистального конца семенника у *Enoplus michaelsoni* (Enoplidae) с целью описания аналогов концевых клеток других нематод.
2. Детально изучить строение мужской половой системы на примере *Anoplostoma cuticularia* (Anoplostomatidae).

3. Изучить строение и развитие сперматозоидов у представителей трех семейств отряда Enoplida (Anoplostomatidae, Leptosomatidae, Tripyloididae).

4. Исследовать развитие диморфных сперматозоидов нематоды *Bathylaimus australis* (Tripyloididae).

5. На основе полученных данных провести сравнительно-цитологический анализ строения мужской половой системы и развития сперматозоидов нематод-эноплид.

Научная новизна. Впервые детально исследован дистальный участок семенника нематоды-эноплиды и показано, что характерную для гонад других нематод специализированную концевую клетку у эноплид представляет многоклеточный эпителий. Впервые с помощью электронной микроскопии детально изучена мужская половая система нематоды-эноплиды и охарактеризована ультраструктура всех ее отделов; впервые детально исследованы предстательные железы свободноживущих нематод-эноплид. Впервые исследован сперматогенез трех видов нематод-эноплид, представителей трех семейств Anoplostomatidae, Leptosomatidae и Tripyloididae и определены общие черты сперматогенеза и сперматозоидов нематод-эноплид. На примере *Bathylaimus australis* (Tripyloididae) впервые исследован феномен диморфизма сперматозоидов у нематод-эноплид и впервые для нематод описано развитие двух типов сперматозоидов (эу- и парасперматозоидов), развивающихся в единственном семеннике.

Теоретическое и практическое значение работы. Анализ строения и развития сперматозоидов нематод может быть полезен для понимания процессов формирования половых клеток у многоклеточных животных, а так же путей возникновения aberrantных сперматозоидов. Полученные в ходе исследования данные могут быть направлены на разработку естественной системы класса Nematoda, являющейся научной основой для прикладной нематологии как раздела гельминтологии. Представленные в диссертации результаты о строении половой системы нематод-эноплид могут быть включены в программу общих и специализированных курсов по эмбриологии и биологии развития, гистологии и

цитологии, зоологии беспозвоночных животных и нематологии для высших учебных заведений.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на 28-м Международном симпозиуме Европейского общества нематологов, (Благоевград, Болгария, 2006); на Седьмом Международном симпозиуме Российского общества нематологов (Петрозаводск, 2007); на Пятом международном конгрессе нематологов (Брисбен, Австралия, 2008); на Международном нематологическом симпозиуме «Нематоды в тропических экосистемах» (Ханой, Вьетнам, 2009); на ежегодных научных конференциях ИБМ ДВО РАН (2008, 2009); на семинарах лаборатории эмбриологии ИБМ ДВО РАН.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, из них две статьи в журналах из списка ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендуемых ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 112 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения полученных данных, выводов и списка литературы. Список литературы включает 104 источника, из которых 92 на иностранных языках. Диссертация включает 15 оригинальных схематических рисунков и 78 оригинальных электронограмм.

Благодарности. Автор выражает благодарность профессору Дальневосточного федерального университета Н.П. Фадеевой за помощь в определении видов нематод и консультации по таксономии и морфологии морских нематод; начальнику отдела электронной микроскопии ИБМ ДВО РАН Фомину Д.В. за обучение и помощь в работе с электронными микроскопами; коллективу лаборатории эмбриологии ИБМ ДВО РАН за консультации и помощь в работе на всех этапах исследований и подготовки диссертации. Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (№№ 05-04-48268, 08-04-00580, 11-04-00368) и ДВО РАН (№ 09-III-A-06-216).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы

В главе приводятся краткие сведения о строении мужской половой системы и данные по электронной микроскопии сперматозоидов нематод, делается вывод об актуальности исследования нематод-эноплид для расширения знаний о репродуктивной биологии свободноживущих морских нематод. В главе кратко характеризуется классификация крупных таксонов нематод Де Лея и Блэкстера (De Ley, Blaxter 2002), которая используется в работе.

Материал и методика

Исследования мужской половой системы и сперматозоидов были выполнены на четырех видах морских свободноживущих нематод - представителей четырех семейств из трех подотрядов отряда Enoplida, таблица 1:

Подотряд	Семейство	Виды	Что изучалось
Enoplina	Enoplidae	<i>Enoplus michaelsoni</i> Linstow, 1896	Дистальная часть семенника
	Anoplostomatidae	<i>Anoplostoma cuticularia</i> Belogurov et Alekseev, 1977	Мужская половая система, Сперматогенез
Ironina	Leptosomatidae	<i>Leptosomatides marinae</i> Platonova, 1976	Спермиогенез
Tripyloidina	Tripyloididae	<i>Bathylaimus australis</i> Cobb, 1894	Сперматогенез, Диморфизм сперматозоидов

Строение гонад, строение и развитие сперматозоидов изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), для чего использовали методы фиксации в глутаральдегиде и тетроксиде осмия, заливки в эпоксидные смолы. Тонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и исследовали на микроскопах Jeol JEM-100S и Zeiss Libra 120. На Libra 120 дополнительно использовалась функция сканирующей трансмиссионной электронной микроскопии (СТЭМ).

Результаты

1. Мужская половая система морских нематод-эноплид

1.1. Дистальный конец семенника *Enoplus michaelsoni* (Enoplida, Enoplina, Enoplidae)

В семенниках эноплид, по аналогии с другими нематодами (аскарида, *C. elegans*), мы рассчитывали обнаружить и исследовать концевую клетку (distal tip cell, DTC), играющую важную роль в регуляции клеточного цикла сперматогенных клеток, однако у *E. michaelsoni* специализированную крупную клетку на дистальном конце семенника обнаружить не удалось. Эпителий дистальной части семенника, окружающий пролиферирующие сперматогонии, построен из множества относительно небольших клеток, эти соматические клетки образуют длинные тонкие отростки, проникающие в полость семенника между сперматогониями и иногда окружая их целиком.

1.2. Мужская половая система *Anoplostoma cuticularia* (Enoplida, Enoplina, Anoplostomatidae)

У *Anoplostoma cuticularia* семенники парные, обращенные, они соединяются с семяпроводом единым семявыносящими каналами, семяпровод открывается в клоаку через семяизвергательный канал (Рис. 1). В семеннике отчетливо выделяются две части – дистальная, содержащая развивающиеся сперматогенные клетки (сперматогонии, сперматоциты и сперматиды) и семенной пузырек, содержащий плотно упакованные незрелые сперматозоиды одинакового строения. Семенник в дистальной части плотно прилегает к кишечнику, растущие сперматоциты отделены от кишечных клеток только тонким слоем эпителия семенника, базальными мембранами эпителиев гонады и кишечника и узким пространством полости тела (Рис. 2А). Отдел сперматид, следующих в семеннике за сперматоцитами, заканчивается коротким, но хорошо выраженным участком

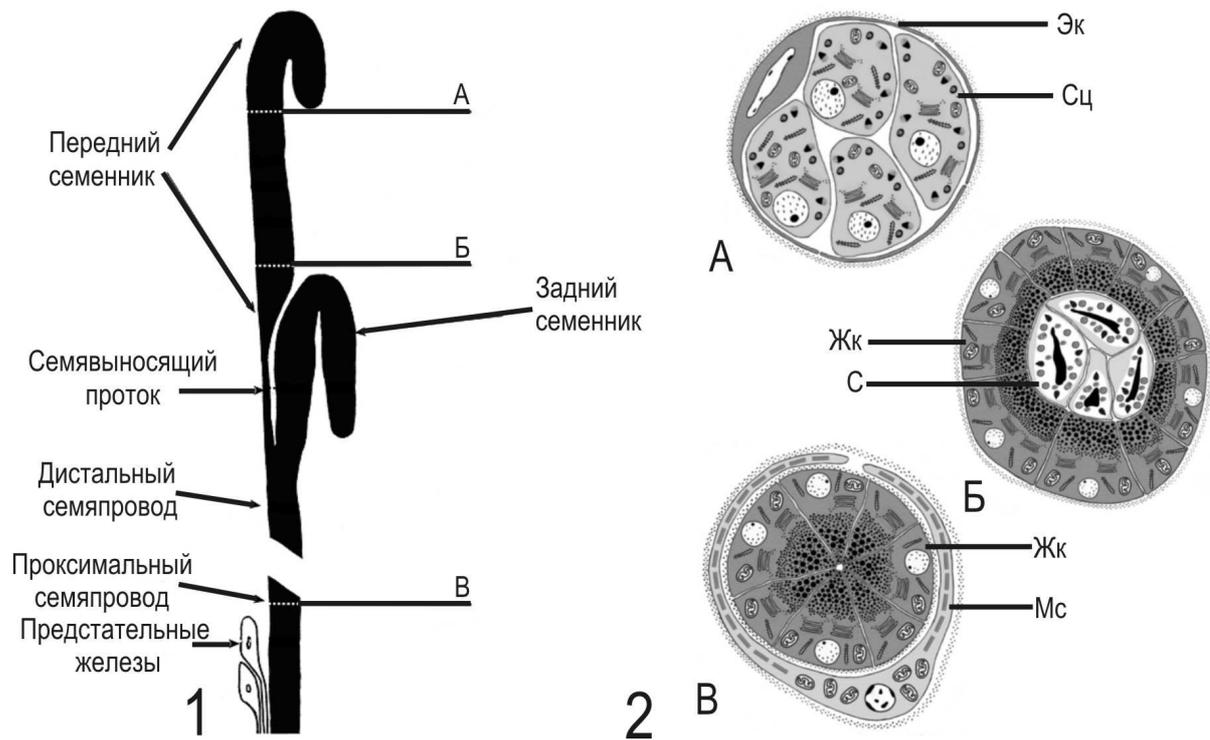


Рис. 1. Приблизительная схема половых трубок мужской половой системы *Anoplostoma cuticularia* с указанием уровней, на которых были сделаны поперечные срезы, показанные на рисунке 2.

Рис. 2. Схемы поперечных срезов мужской половой системы *Anoplostoma cuticularia*. А – поперечный срез семенника в районе сперматоцитов; Б – поперечный срез семенника в районе семенного пузырька; В - поперечный срез проксимальной части семяпровода. Обозначения: Жк – железистая клетка эпителия семенника, Мс – мышечная клетка стенки семяпровода, С – сперматозоид, Сц – сперматоцит, Эк – эпителиальная клетка семенника.

семенника, в котором происходит отделение резидуальных тел.

Железистый семенной пузырек охватывает кластер плотно упакованных незрелых сперматозоидов (Рис. 2Б). Эпителиальные клетки семенного пузырька имеют базально расположенные ядра неправильной формы, цитоплазма клеток включает развитый синтетический аппарат (цистерны ЭПР и диктиосомы, рибосомы, многочисленные митохондрии) и заполнена сферическими осмиофильными гранулами секрета.

В дистальной части семяпровод состоит только из эпителиальных клеток, в проксимальной части со стороны базальной мембраны эпителий семяпровода одет слоем гладкой мускулатуры (Рис. 2В). Семяпровод представляет собой эпителиальную трубку с узким центральным просветом. Железистые клетки

семяпровода имеют базально расположенное ядро, в цитоплазме клеток множество рибосом и митохондрий, цистерн ШЭР и диктиосом. Апикальная часть клетки содержит большое количество осмиофильных сферических секреторных гранул. В проксимальной части со стороны бластоцеля трубка семяпровода охватывается гладкими мышечными клетками, формирующими кольчатую перистальтическую мускулатуру (Рис. 2В).

Семяпровод открывается в клоаку, куда также открываются протоки двух одноклеточных предстательных желез. Тела этих крупных железистых клеток, хорошо заметных и на тотальных препаратах, располагаются друг за другом над кишкой и семяпроводом (Рис. 1). Клетки имеют одинаковое строение: тело клетки содержит крупное ядро с ядрышком, хорошо развитый ШЭР, диктиосомы и митохондрии. В основании протоки каждая клетка содержит скопление осмиофильных секреторных гранул характерной овальной формы, затем клетка переходит в длинный тонкий отросток («проток»), соединяющийся с клоакой в месте присоединения семяпровода.

2. Развитие и строение сперматозоидов нематод-эноплид

В главе представлены результаты исследования строения и развития сперматозоидов нематод отряда Enoplida из трех семейств, представляющих подотряды Enoplina, Ironina и Tripyloidina.

2.1. *Anoplostoma cuticularia* (Enoplida, Enoplina, Anoplostomatidae)

В цитоплазме растущих **сперматоцитов** появляется много митохондрий, развивается мощный синтетический аппарат в виде многочисленных рибосом, цистерн ШЭР и диктиосом (Рис. 3Б). Результатом синтетической активности является формирование большого количества мембранных органелл (МО) и волокнистых тел (ВТ), уникальных клеточных органелл, характерных только для сперматогенных клеток нематод. В поздних сперматоцитах происходит трансформация МО и разделение их на два легко различимых компонента.

Осмофильная цистерна освобождает центральную, «сетчатую», часть пузырька. При этом осмофильное содержимое цистерны становится волокнистым, а «сеточка» теряет свое содержимое и становится сложной системой мембран. В конечном счете, вакуоли с волокнистым содержимым становятся самостоятельным компонентом цитоплазмы. Эти вакуоли следует идентифицировать как волокнистые тела, ВТ, обнаруженные в сперматогенных клетках многих других нематод. В то же время в цитоплазме остаются пузырьки с системой внутренних мембран, не потерявшие осмофильное содержимое, МО.

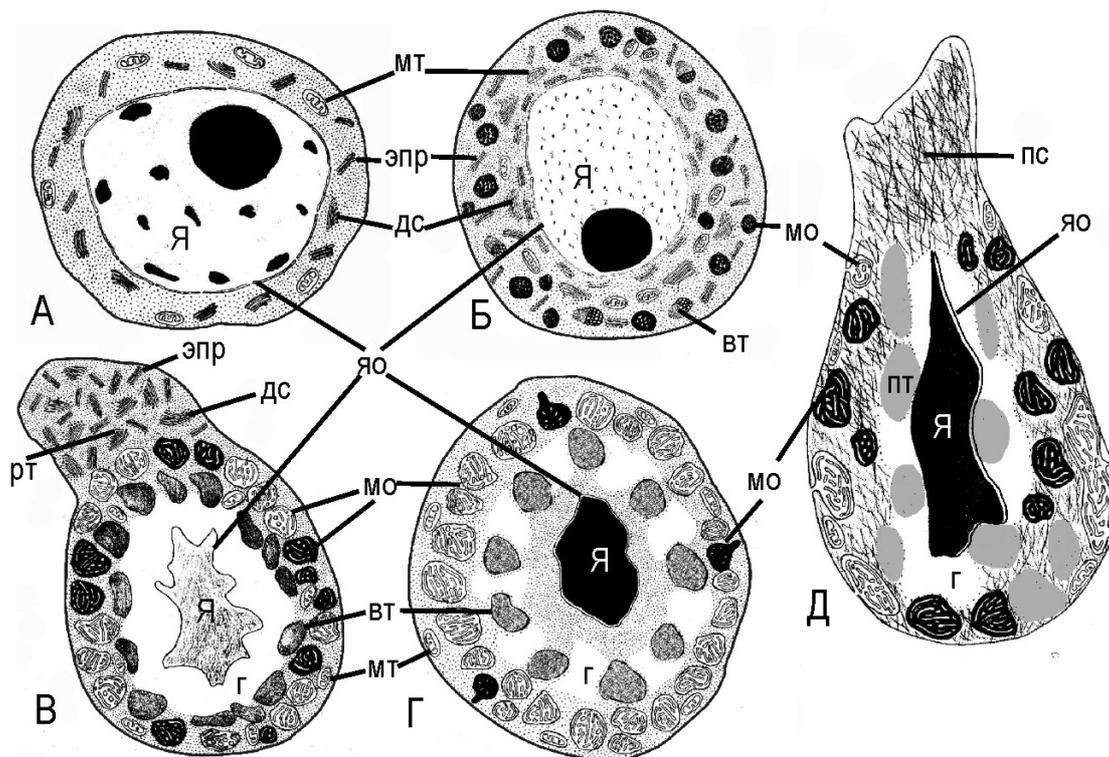


Рис. 3. Схема сперматогенеза у *Anoplostoma cuticularia*. А. Сперматогоний. Б. Сперматоцит. В. Сперматид. Г. Незрелый сперматозоид. Д. Зрелый сперматозоид. Обозначения: г – гало; вт – волокнистые тела; дс – диктиосома; мо – мембранные органеллы; мт – митохондрии; пс – псевдоподия; пт – плотные тела; рт – резидуальное тело; эпр – эндоплазматический ретикулум; яо – ядерная оболочка; Я – ядро.

Мейоз в семенниках наблюдать не удалось, непосредственно за сперматоцитами располагаются **сперматиды**. Это округлые или овальные клетки с центрально расположенным лопастным ядром (Рис. 3В). Ядро имеет ядерную оболочку, оно окружено обширным электроносветлым гало. Периферическая часть цитоплазмы сперматиды включает митохондрии, ВТ и МО. У одного из

поллюсов главное тело сперматиды соединяется мостиком с резидуальным телом, в котором сконцентрирован синтетический аппарат клетки.

Проксимальный отдел семенника, семенной пузырек, заполнен **незрелыми сперматозоидами**, формирующимися после отделения резидуального тела. Это неполяризованные полигональные клетки, содержащие центрально расположенное ядро неправильной формы (Рис. 3Г). Хроматин полностью конденсирован, ядерная оболочка различима за счет тонкого светлого пространства, разделяющего ее и хроматин. Ядро окружено прозрачным гало, на периферии клетки сохраняется набор органелл, характерных для сперматиды.

Зрелые сперматозоиды из матки отчетливо поляризованы, они имеют на переднем конце небольшую псевдоподию, с помощью которой прикрепляются к стенке матки (Рис. 3Д). Ядро лопастное, хроматин конденсирован, ядерная оболочка различима только на больших увеличениях. Ядро окружено прозрачным гало, к ядру часто прилегают аморфные овальные или округлые тела (ВТ), на периферии клетки концентрируются МО и редкие митохондрии.

2.2. *Leptosomatides marinae* (Ironina, Leptosomatidae)

По окончании мейоза в **сперматидах** происходят преобразования гаплоидного ядра и развитие цитоплазмы. В начальной стадии коллапса ядра хроматин еще остается в виде отдельных конденсированных хромосом, окруженных четко различимой ядерной оболочкой. На этой стадии в цитоплазме отмечается также резкое увеличение количества митохондрий, цистерн ШЭР и диктиосом, но количество еще МО незначительно. На следующей стадии ядро уменьшается в диаметре, становится сферическим, хроматин превращается в единую губчатую массу, появляется множество диктиосом с осмиофильными цистернами, они соседствуют с растущими МО, непосредственно участвуя в их формировании (Рис. 4В). На завершающих стадиях формирования сперматиды ядро начинает удлиняться, хроматин трансформируется в продольные ленты (Рис. 4Г).

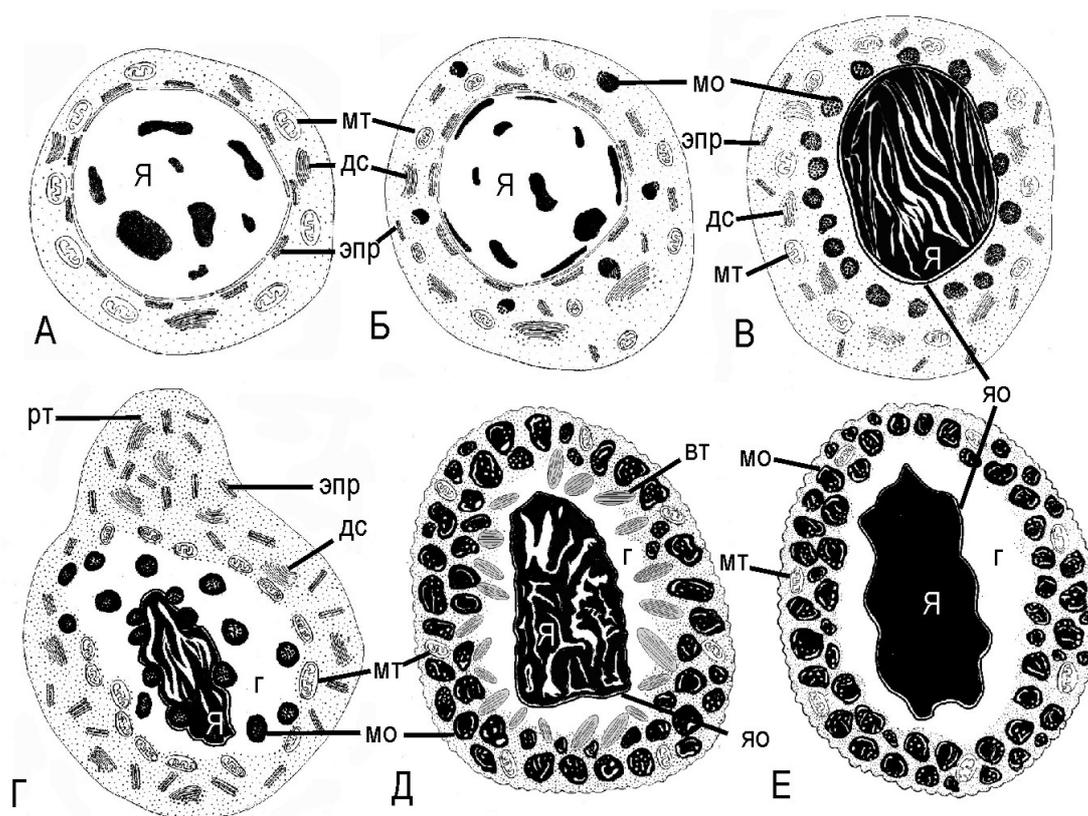


Рис. 4. Схема сперматогенеза у *Leptosomatides marinae*. А. Сперматогоний. Б. Сперматоцит. В. Ранняя сперматίδα. Г. Поздняя сперматίδα. Д. Ранний незрелый сперматозоид. Е. Незрелый сперматозоид. Обозначения: г – гало; вт – волокнистые тела; дс – диктиосома; мо – мембранные органеллы; мт – митохондрии; рт – резидуальное тело; эпр – эндоплазматический ретикулум; яо – ядерная оболочка; Я – ядро.

В поздних сперматидеах цитоплазма становится отчетливо сегрегированной, МО концентрируются вокруг ядра, митохондрии и органеллы синтеза оказываются на периферии клетки.

После отделения резидуального тела формируются **незрелые сперматозоиды**. Ранние незрелые сперматозоиды, располагающиеся непосредственно за зоной сперматид, сохраняют предыдущее характерное состояние хроматина (Рис. 4Г). Центральное вытянутое ядро с ядерной оболочкой окружено слоем цитоплазмы, основу которого составляют МО. В приядерной зоне и между МО встречаются тяжи филаментозного материала со слабо выраженной продольной исчерченностью. По аналогии со сперматозоидами других нематод, эти тяжи

можно интерпретировать в качестве ВТ. Между МО встречаются также редкие митохондрии. Окончательно сформировавшиеся сперматозоиды из семенника - это овальные клетки длиной до 20 мкм и шириной 6-8 мкм. Эти сперматозоиды имеют вытянутое ядро из полностью конденсированного хроматина, представляющего собой осмиофильную массу неправильной формы (Рис. 4Г). Ядро окружено прозрачным гало, а периферия клетки представляет собой плотный матрикс, в который погружены МО и немногочисленные митохондрии; ВТ на этой стадии не обнаруживаются.

2.3. *Bathylaimus australis* (Tripyloidina, Tripyloididae)

Зрелые сперматозоиды *B. australis*, обнаруженные в матке, это небольшие клетки длиной 4-5 мкм и шириной 2 мкм. Диффузный хроматин ядра окружает ядерная оболочка, в цитоплазме располагаются митохондрии и две крупные мембранные органеллы, расположенные на противоположных полюсах клетки.

У самцов в единственном семеннике развиваются два типа половых продуктов – «эусперматозоиды» и «парасперматозоиды». Эусперматозоиды - это клетки с ядрами нормальных размеров и строения, описанные Юшиным и Малаховым (1999) в половых путях самок. Парасперматозоиды – особый вид клеток, имеющих значительно меньшие размеры и лишённые, по-видимому, не только ядра, но и всего или почти всего ядерного хроматина. Дистальная часть семенника содержит одинаковые **сперматоциты**, Стадии делений мейоза в изученных семенниках не были обнаружены, но результатом их становятся клоны сперматид, содержащие десятки (точное число не установлено) ядер.

Развитие эусперматозоидов

Основные события по формированию ядер и содержимого цитоплазмы эусперматозоидов происходят в клонах **сперматид**. После завершения делений мейоза формируется обширная цитоплазматическая масса, в которой равномерно рассеяны гаплоидные ядра овальной формы. Хроматин ядер окружен вновь сформировавшейся ядерной оболочкой, обширная цитоплазма заполнена

рибосомами, митохондриями, цистернами ШЭР и диктиосомами. Позднее ядра выделяются в цитоплазматические компартменты, соединенные с общей цитоплазмой (резидуальным телом) мостиками. В компартментах кроме ядра и митохондрий концентрируются цистерны с прозрачным содержимым - предшественники МО. Поздние сперматиды имеют центральное ядро окруженное митохондриями, а на двух противоположных полюсах клетки концентрируются цистерны – предшественники МО.

Незрелые сперматозоиды из семенного пузырька имеют размеры 6 мкм, В центре клетки располагается ядро, окруженное митохондриями, на противоположных концах клетки расположены мембранные органеллы, содержащие плотную субстанцию (Рис. 4 А).

Развитие парасперматозоидов

Парасперматозоиды также развиваются в клонах. После мейоза в обширной цитоплазматической массе клона формируется огромное количество вакуолей размером около 2 мкм с осмиофильным содержимым. Эти вакуоли, по-видимому, аналогичны типичным МО сперматозоидов нематод. Цитоплазма клетки, формирующей МО, наполнена рибосомами, в ней много митохондрий, диктиосом, цистерн ШЭР. В цитоплазме встречаются также многочисленные осмиофильные сферы диаметром 0,6 мкм.

В более поздних клонах наблюдается концентрация трех компонентов цитоплазмы – МО, митохондрий и плотных сфер - в многочисленные небольшие кластеры, каждый из которых выделяется в отдельный цитоплазматический компартмент, окруженный мембраной. Каждый компартмент содержит только одну МО, одну или две сферы и несколько небольших митохондрий. В кластерах органеллы организованы в определенном порядке, который сохраняется и в дальнейшем, когда парасперматозоиды отделяются от резидуального тела и становятся самостоятельными компонентами эякулята (Рис. 4Б). Центр клетки занимает МО, заполненная осмиофильным содержимым, МО окружена

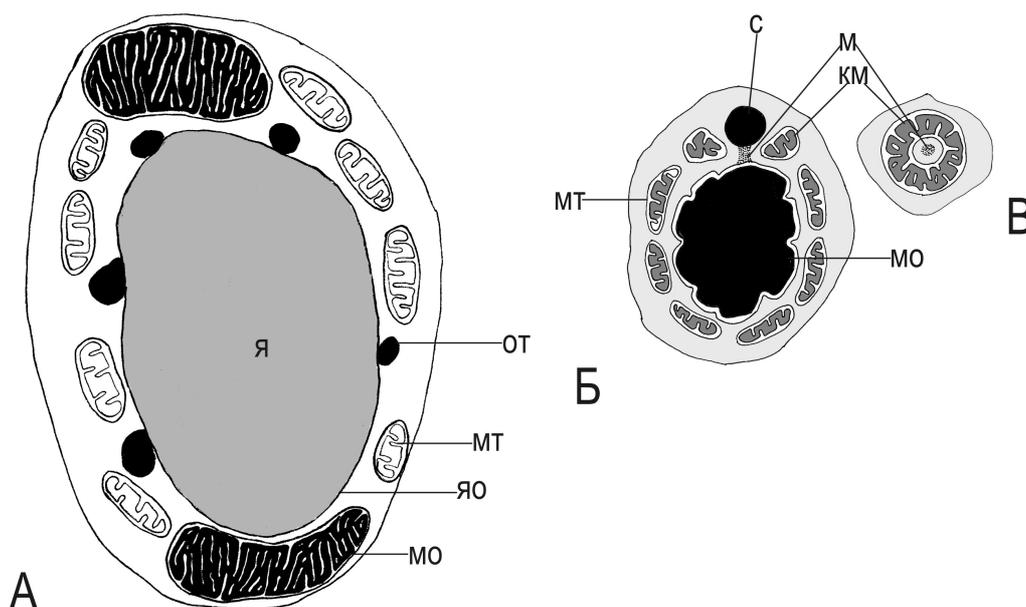


Рис. 5. Схема строения сперматозоидов *Bathylaimus australis*. А. Незрелый эусперматозоид из семенного пузырька. Б. Парасперматозоид. В. Схема среза через кольцевую митохондрию парасперматозоида. Обозначения: км – кольцевая митохондрия; м – мостик; мо – мембранные органеллы; мт – митохондрии; ос – осмиофильные тельца; с – осмиофильная сфера; яо – ядерная оболочка; я – ядро.

митохондриями. У одного из полюсов располагается плотная сфера, соединенная с МО аморфным мостиком толщиной 70 нм. В результате общая структура клетки приобретает очевидную поляризованность. Мостик, соединяющий сферу с МО, окружен митохондрией, имеющей форму кольца (Рис. 4В).

В дистальной части семенника – семенном пузырьке - скапливаются сперматозоиды двух типов: крупные **эусперматозоиды** и многочисленные **парасперматозоиды** меньших размеров (Рис. 4А, Б). Матка *B. australis* содержит относительно небольшое количество эусперматозоидов наряду с большим количеством парасперматозоидов.

Обсуждение

1. Концевая клетка в мужской половой системе нематод

У большинства изученных нематод в гонадах описана единственная концевая клетка (cap cell или distal tip cell) - крупная эпителиальная клетка, располагающаяся на дистальном конце гонады (Zograf, 2010). Эти клетки регулируют клеточный цикл герминативных клеток, поддерживая пул герминативных клеток, размножающихся митозом (Kimble, White, 1981). У энопиды *E. michaelsoni* в дистальном конце семенник состоит из множества эпителиальных клеток, которые, по-видимому, являются гомологом концевой клетки. Единственная концевая клетка отражает детерминированность развития большинства нематод, у которых наблюдается явление эутелии. Отсутствие концевой клетки у энопид, имеющих недетерминированное развитие, можно трактовать, как еще один плезиоморфный признак этого таксона нематод.

2. Мужская половая система нематод-энопид

Как мы установили на примере *A. cuticularia*, эпителий семенника неоднороден. В районе развивающихся сперматоцитов эпителий очень тонкий, в проксимальной части – это толстый железистый эпителий, который охватывает пул незрелых сперматозоидов. Подобное строение отмечено и для семенников других нематод (Shepherd *et al.*, 1973; Shepherd, Clark, 1976; Hess, Poinar, 1986). Обычно семенник находится в плотном контакте с кишечником, из которого, поступают питательные вещества в развивающиеся клетки (Wolf *et al.*, 1978).

Семенной пузырёк большинства нематод – это расширенная проксимальная часть семенника, содержащая сперматозоиды. Клетки эпителия здесь утолщены и имеют выраженную железистую природу. По-видимому, семенной пузырёк создаёт специальную среду для сохранения половых продуктов (Marcaillou, Szöllösi, 1980). Также важной функцией эпителия семенного пузырька является абсорбция abortивных или избыточных половых продуктов (Zograf, 2010).

Семяпровод *A. cuticularia* представляет собой трубку с небольшим просветом, построенную из множества железистых эпителиальных клеток. На всем протяжении со стороны бластоцеля к базальной мембране семяпровода прилегают мышечные клетки. Такое трубчатое строение семяпровода характерно и для другой эноплиды - *D. californicum* (Норе, 1974).

Предстательные железы на электронно-микроскопическом уровне впервые были описаны у нематоды-хромадорида *Paracyatholaimus pugettensis* (Zograf, 2010). Это крупные железистые клетки, соединенные узкими протоками (шейками) с клоакой в месте впадения семяпровода (семяизвергательного канала). У *A. cuticularia* имеются 2 крупные предстательные железы, расположенные дорзально одна за другой, протоки желез открываются в клоаку.

3. Сперматозоиды и сперматогенез нематод-эноплид

Сперматозоиды нематод глубоко модифицированы и обычно характеризуются как аберрантные (Baccetti, Afzelius, 1976; Реунов, 2005). Они не имеют аксонемы и акросомы, обычно это биполярные амебоидные клетки с передней псевдоподией и задним главным телом клетки, включающим ядро и органеллы (Justine, 2002). Для подавляющего большинства сперматозоидов характерно отсутствие ядерной оболочки и развитие уникальных аберрантных органелл - так называемых "мембранных органелл" и "волокнистых тел". Накопившиеся данные по нематодам-эноплидам позволяют обсудить общие черты и отличия в развитии и строении их мужских гамет (табл. 2).

3.1. Форма и размеры сперматозоидов

Размеры сперматозоидов нематод могут различаться на порядок. Наиболее крупные сперматозоиды описаны у аскариды - 27 мкм в длину (Sepsenwol *et al.*, 1989). Сходные размеры (28 мкм в длину) имеют и сперматозоиды эноплиды *Enoplus anisospiculus* (Yushin, Malakhov, 1994). Различны размеры и у изученных нами сперматозоидов. У *L. marinae* сперматозоиды имеют 20 мкм в длину и 6-8 мкм в

Таблица 2. Ядерная оболочка в сперматозоидах нематод отряда Enoplida.

Подотряд Семейство	Изученные виды	Ядерная оболочка	Ссылки
Enoplina			
Enoplidae	<i>Enoplus demani</i>	+	Yushin, Malakhov, 1994
	<i>Enoplus anisospiculus</i>	+	Yushin, Malakhov, 1998
Thoracostomopsidae	<i>Mesacanthion hirsutum</i>	+	Baccetti <i>et al.</i> , 1983
	<i>Enoploides delamarei</i>	+	Justine, Jamieson, 1999
Anoplostomatidae	<i>Anoplostoma cuticularia</i>	+	Afanasiev-Grigoriev, Yushin, 2007
Anticomidae	<i>Anticoma possjetica</i>	+	Yushin, 2003
Oncholaimina			
Oncholaimidae	<i>Adoncholaimus fuscus</i>	Не обнаружена	Calcoen, Dekegel, 1979
	<i>Pontonema vulgare</i>	+	Yushin <i>et al.</i> , 2002
Ironina			
Leptosomatidae	<i>Deontostoma californicum</i>	Не обнаружена	Wright <i>et al.</i> , 1973
	<i>Leptosomatides marinae</i>	+	Afanasiev-Grigoriev <i>et al.</i>, 2006; Afanasiev-Grigoriev, Yushin, 2009
Oxystominidae	<i>Halalaimus leptoderma</i>	+	Turpeenniemi, 1998
Tripyloidina			
Tripyloididae	<i>Bathylaimus australis</i>	+	Yushin, Malakhov, 1999; Afanasiev-Grigoriev, Yushin, 2009

ширину, у *A. cuticularia* вытянутые сперматозоиды имеют длину 8,5 мкм, эусперматозоиды *B. australis* длиной 6 мкм, а парасперматозоиды всего 2 мкм.

3.2. Ядро сперматозоидов

В большинстве случаев хроматин ядра в спермиях нематод конденсируется до единой плотной массы. В сперматиде эноплид описаны самые различные состояния конденсации ядерного хроматина – гомогенная масса, структурирование в виде лент, диффузное состояние неполной конденсации.

3.3. Ядерная оболочка

Одна из основных особенностей сперматозоидов нематод – это отсутствие ядерной оболочки, которая не восстанавливается после мейотических делений (Justine, 2002). Исключение составляют лишь представители отряда эноплид, у которых ядерная оболочка сохраняется на всех стадиях сперматогенеза. К настоящему моменту ядерная оболочка в сперматозоидах известна для представителей 8 семейств из 4 подотрядов отряда Enoplida (табл. 2). Потеря ядерной оболочки указывает на высокую специализацию мужских гамет, тогда как сохранение ее может быть истолковано как плезиоморфный признак.

3.4. Митохондрии

Большинство сперматозоидов нематод имеют многочисленные митохондрии обычного для соматических клеток строения (Justine, Jamieson, 1999; Justine, 2002). Для двух отрядов нематод (Mononchida и Dioctophymida – оба из подкласса Enoplia) сообщается о редукции митохондрий в сперматогенезе (Justine, 2002).

Функции митохондрий, по-видимому, тесно связаны с подвижностью сперматозоидов. Это проявляется в том, что у всех поляризованных сперматозоидов основная масса митохондрий скапливается под подвижной псевдоподией, на границе между цитоскелетом псевдоподии и цитоплазмой

главного тела клетки (Sepsenwol *et al.*, 1989). Концентрация митохондрий под псевдоподией наблюдалась также в поляризованных сперматозоидах эноплид *Enoplus anisospiculus* и *Anticoma possjetica* (Yushin, Malakhov 1998; Yushin, 2003).

3.5. Синтетический аппарат клетки

Считается, что основные процессы синтеза в клетке завершаются перед мейозом, в сперматоцитах, а в сперматиде происходит только перераспределение органелл и вещества в клетке (Foor, 1983). Для некоторых нематод резидуальная цитоплазма, удаляющаяся с резидуальным телом, – это не просто пассивноеместилище для отработавших органелл, но активно-синтезирующая часть сперматиды, без которой были бы невозможны дальнейшие преобразования клетки. Формирование МО и ВТ у ряда нематод-эноплид начинается лишь в сперматиде. Так у *Enoplus anisospiculus* (Yushin, Malakhov, 1998) и *L. marinae* ВТ формируются только на стадии поздней сперматиды, у *Anticoma possjetica* (Yushin, 2003) МО появляются в ранней сперматиде, только на стадии сперматид происходит пролиферация МО у *L. marinae*.

3.6. Мембранные органеллы, волокнистые тела и их комплексы

Аберрантные органеллы – мембранные органеллы (МО) и волокнистые тела (ВТ) - рассматриваются как уникальная особенность сперматозоидов нематод (Justine, 2002). Оба типа органелл находят в спермиях эноплид (Turpeenniemi, 1998; Justine, Jamieson, 1999; Yushin *et al.*, 2002, настоящая работа).

Существуют различные комбинации МО и ВТ в сперматогенезе нематод. У некоторых нематод МО и ВТ развиваются в комплексе, это характерно для многих рабдитид и известно для монхистерид (Justine, Jamieson, 1999). У эноплид МО и ВТ развиваются отдельно друг от друга, без образования комплексов (Yushin, Malakhov, 1998; Turpeenniemi, 1998; Justine, Jamieson, 1999; Yushin *et al.*, 2002).

3.7. Активация сперматозоидов

Активация сперматозоидов у нематод происходит в половых путях самки. При активации происходит опорожнение мембранных органелл и соединение их с внешним пространством через пору. Процессы активации, по-видимому, такие же и у изученных эноплид. Зрелые сперматозоиды, обнаруженные в матке *A. cuticularia* и *B. australis*, содержат типичные опорощенные МО с внутренней системой мембран и открытые наружу порами.

3.8. Диморфизм сперматозоидов

У самцов эноплиды *B. australis* в семеннике развиваются два типа половых продуктов – «эусперматозоиды» и «парасперматозоиды». Первые - это клетки с ядрами нормальных размеров и строения, парасперматозоиды – особый вид клеток, которые лишены нормально развитого ядра и имеют очень маленькие размеры. В дистальной части семенника – семенном пузырьке - скапливаются сперматозоиды двух типов: крупные эусперматозоиды и многочисленные парасперматозоиды меньших размеров. Функция парасперматозоидов *B. australis* пока остается загадочной.

Описаны и другие случаи диморфизма сперматозоидов нематод, у которых диморфизм мужских гамет возникает независимо как у свободноживущих, так и у паразитических групп, при этом радикальное различие в размерах и строении сперматозоидов, производимых одной особью, у каждого вида развивается для решения совершенно разных задач репродуктивной стратегии (Yushin, 2008).

ВЫВОДЫ

1. Характерной особенностью мужской половой системы нематод-эноплид можно считать отсутствие специализированной эпителиальной концевой клетки на дистальном конце семенника. У эноплид регуляторную функцию концевой клетки других нематод, по-видимому, выполняют множественные эпителиальные

клетки дистальной части стенки семенника, окружающие пул пролиферирующих сперматогониев.

2. На примере нематоды *Anoplostoma cuticularia* показано, что мужская половая система эноплид состоит из трех основных частей – семенников, семяпровода и предстательных желез:

- эпителий семенников состоит из очень тонкого эпителия средней части, окружающего развивающиеся сперматоциты и сперматиды, а также из железистого семенного пузырька, содержащего незрелые сперматозоиды;

- семяпровод эноплид представляет собой настоящую эпителиальную трубку, построенную из множества железистых клеток; со стороны полости тела семяпровод охватывается кольцевыми эпителиально-мышечными клетками;

- вместе с семяпроводом в клоаку впадают протоки двух одноклеточных предстательных желез.

3. На основе изучения трех видов нематод-эноплид, представителей трех семейств из трех подотрядов и анализа литературных данных можно заключить, что общими чертами сперматогенеза эноплид можно считать сохранение ядерной оболочки в сперматозоидах, отсутствие центриолей, обилие митохондрий обычного для соматических клеток строения, развитие мембранных органелл в целом сходного строения у всех эноплид. Волокнистые тела, предположительно аккумулирующие цитоскелетный белок MSP, у эноплид встречаются редко и никогда не объединяются в комплексы с мембранными органеллами.

4. Отсутствие концевой клетки в эпителии семенника, трубчатый семяпровод, сохранение ядерной оболочки у сперматозоидов, необычное разнообразие паттернов сперматогенеза эноплид могут рассматриваться как плезиоморфные признаки, подчеркивающие общую примитивность эноплид среди других таксонов нематод.

5. У эноплиды *Bathylaimus australis* наблюдается радикальный диморфизм сперматозоидов, которые развиваются отдельными клонами в единственном семеннике. Фертильные эусперматозоиды имеют строение, обычное для сперматозоидов эноплид; нефертильные парасперматозоиды не имеют нормально развитого ядра, их основу составляет гипертрофированная мембранная органелла.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. Afanasiev-Grigoriev A.G., Zograf J.K., Yushin V.V. Nuclear envelope in the spermatozoa of the leptosomatid nematode *Leptosomatides marinae* (Enoplida, Leptosomatidae) // Russian Journal of Nematology. 2006. V. 14. P. 119-125.

2. Афанасьев-Григорьев А.Г., Юшин В.В. Электронно-микроскопическое исследование спермиогенеза у свободноживущей морской нематоды *Leptosomatides marinae* Platonova 1976 (Enoplida: Leptosomatidae) // Биология моря. 2009. Т. 35, №2. С. 124-131.

Публикации в материалах конференций:

3. Afanasiev-Grigoriev A.G., Yushin V.V. Nuclear envelope in spermatozoa of the leptosomatid nematode, *Leptosomatides marinae* (Enoplida, Leptosomatidae) // European Society of Nematologists XXVIII International Symposium of the European Society of Nematologists, Blagoevgrad, Bulgaria, 5-9 June 2006: Programme and Abstracts. Sofia-Moscow: Pentsoft, 2006. P. 160.

4. Afanasiev-Grigoriev A.G., Yushin V.V. Electron microscope study of spermatogenesis in *Anoplostoma cuticularia* (Enoplida, Anoplostomatidae) // Russian Journal of Nematology. 2007. V. 15. №2. P. 138.

5. Afanasiev-Grigoriev A.G., Yushin V.V. Sperm development in the free-living marine nematode *Leptosomatides marinae* (Enoplida, Leptosomatidae) // 5th International Congress of Nematology, 13-18 July 2008, Brisbane, Australia: Abstracts. 2008. P. 194.

6. Yushin V.V., Afanasiev-Grigoriev A.G. Euspermatozoa and paraspermatazoa in nematodes: spermatogenesis in the tryplidid nematode *Bathylaimus australis* (Enoplida, Tryplididae) // International Nematology Symposium "Nematodes in Tropical Ecosystems", Hanoi, Vietnam, 17-21 August 2009: Program & Abstracts. 2009. Hanoi, IEBR-VAST, P. 41.

7. Afanasiev-Grigoriev A.G., Yushin V.V. Absence of a distal tip cell in testes of the marine enoplid *Enoplus michaelsoni* (Enoplida, Enoplidae) // International Nematology Symposium "Nematodes in Tropical Ecosystems", Hanoi, Vietnam, 17-21 August 2009, Program & Abstracts. 2009. Hanoi, IEBR-VAST, P. 44.