

Badania rozwoju embrionalnego tasiemca *Mosgovoyia ctenoides* (Anoplocephalidae)*

Embryonic development of the cestode *Mosgovoyia ctenoides* (Anoplocephalidae)

Daniel Młocicki

Praca doktorska wykonana w Instytucie Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN w Warszawie i obroniona 24 października 2006 r.

Promotor: Prof. dr hab. Zdzisław Świdorski
Recenzenci: Prof. dr hab. Barbara Grytner-Zięcina
Prof. dr hab. Teresa Pojmańska

ABSTRACT. In this study the cleavage divisions and the ultrastructural analysis of early embryos as well as cellular organisation of infective oncosphere of the anoplocephalid cestode *Mosgovoyia ctenoides* are described. The early cleavage is unequal and results in the formation of three types of blastomeres: 2 large macromeres containing large electron dense granules, 3 medium-size mesomeres and several small micromeres.

In the early stage of oncospherical morphogenesis, formation of three following primary embryonic envelopes takes place: (1) the capsule replaced by thick, rigid outer coat originated from the uterine material secretion, (2) the outer envelope and (3) the inner envelope. The capsule is formed from the vitellocyte material. Two macromeres contribute to the formation of the outer envelope and three mesomeres take part in the formation of the inner envelope. The inner envelope undergoes differentiation into three sublayers: (1) a thick extraembryophoral cytoplasmic layer, (2) an electron-dense embryophore, as a stiff pyriform apparatus, and (3) a thin intraembryophoral cytoplasmic layer containing mesomere nuclei. The oncosphere is located in the extended cupule-like part of the pyriform apparatus. Four egg envelopes surround the mature infective oncosphere of *M. ctenoides*: (1) a thick outer coat, (2) the outer envelope, (3) the inner envelope with a characteristic pyriform apparatus and (4) the oncospherical membrane.

Hook morphogenesis takes place inside six symmetrically arranged oncoblasts, each of which shows a characteristic large nucleus of semi-lunar shape. At the beginning the „hook-forming center” appears in the cytoplasmic part of each oncoblast. It consists of numerous free ribosomes, polyribosomes, mitochondria and Golgi complexes. The hook-forming center is involved in synthesis of a hook primordium, which undergoes differentiation and elongation into the fully developed hook. Mature hook consists of three parts: (1) blade, (2) shank, (3) base, and at the site of its protrusion from the oncosphere, is surrounded by a circular septate junction. Wide bands of hook muscles are attached to the basal and collar parts of the hook. The hook blades project outside the oncospherical body into a large cavity that is delimited by the hook region membrane. In the fully developed oncosphere of *M. ctenoides* three pairs of oncospherical hooks together with specialized hook muscles form a complex of „hook muscle system”, responsible for coordinated hook action.

The surface of the infective oncosphere is covered by a thin cytoplasmic layer of oncospherical tegument connected with the so-called "binucleate subtegumental cell", situated deeper in the oncospherical body. Below the cytoplasmic layer are situated wide bands of the somatic musculature responsible for oncospherical body movements. Five major types of oncospherical cells have been distinguished in the infective oncosphere: (1) a binucleate subtegumental cell, (2) a binucleate penetration gland, (3) two nerve cells, (4) numerous somatic cells, and (5) six germinative cells.

During development of the oncosphere, changes in the concentration of glycogen and number of lipid droplets were observed. In the early embryos glycogen particles were most abundant in the macromere cytoplasm, whereas in micromeres concentration of glycogen was observed to be lower. In the course of the differentiation of the oncospherical envelopes glycogen was progressively distributed to other parts of the developing embryo. Simultaneously, a great

*Praca zrealizowana w ramach projektu badawczego nr 2PO4C 12129

increase in the number of lipid droplets was detected. However, during the preoncospherical phase of development a progressive reduction of lipid droplets was observed. This may indicate that lipids play a role of the energy source for developing oncosphere.

Key words: Anoplocephalidae, Cestoda, *Mosgovoyia ctenoides*, oncosphere, ultrastructure.

Streszczenie

Celem pracy było dokładne opisanie rozwoju embrionalnego tasiemca *Mosgovoyia ctenoides* (Ralliet, 1890) Beveridge, 1978, począwszy od bruzdkowania, poprzez różnicowanie oraz ultrastrukturę otoczek onkosfery i rozwijającego się zarodka, aż do organizacji komórkowej w dojrzałej onkosferze. Dodatkowym zadaniem było poznanie znaczenia glikogenu i lipidów oraz ich przemian zachodzących podczas embriogenezy, jak również potwierdzenie apoptozy części blastomerów, odbywającej się prawdopodobnie w trakcie różnicowania i rozwoju onkosfery.

Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do lepszego poznania rozwoju embrionalnego Anoplocephalidae, budowy i organizacji komórkowej onkosfer oraz funkcji otaczających je struktur onkosfery i macicznych, jak również dostarczyć użytecznych kryteriów do analiz pokrewieństwa i filogenezy w obrębie płazińców.

Mosgovoyia ctenoides jest tasiemcem pasożytniczym w jelicie cienkim królików oraz zajęcy. Żywicielem pośrednim są mechowce, w których rozwija się z onkosfery cysticerkoid.

Zarażenie pasożytami z rodzaju *Mosgovoyia* jest szczególnie niebezpieczne dla zwierząt młodych i osłabionych oraz tzw. „miniaturek”. Obecność tego pasożyta w hodowlach królików może powodować znaczne straty ekonomiczne, związane ze zwiększoną śmiertelnością, zmniejszonymi przyrostami masy ciała, obniżeniem jakości futra oraz zmniejszeniem przychovu.

Przez wiele lat i mimo stosunkowo licznych badań embriogenezy tasiemców niewiele było wiadomo na temat rozwoju onkosfer Anoplocephalidae, a otrzymane wyniki formowały nowe, coraz trudniejsze pytania. W związku z tym podjęcie badań w celu analizy rozwoju embrionalnego tasiemca z tej zagadkowej grupy wydawało się w pełni uzasadnione.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji i analiz cytochemicznych stwierdzono, że delikatna kapsułka, otaczająca bruzdkujący zarodek, powstaje z pojedynczej komórki żółtkowej. Jest ona następnie inkrustowana materiałem macicznym i zastępo-

wana twardym, osmofilnym płaszczem zewnętrznym (skorupką).

Brudkowanie zygoty *M. ctenoides* jest całkowite, nierównomierne i prowadzi do powstania trzech, różniących się wielkością i ultrastrukturą typów blastomerów: dużych makromerów, średniej wielkości mezomerów i najmniejszych mikromerów. Prawdopodobnie, w podziałach brudkowania biorą udział wyłącznie makromery. Ultrastruktura blastomerów wskazuje na występowanie wyraźnych różnic w zawartości ich cytoplazmy i stosunku jądro-cytoplazmatycznym. Makromery wykazują najmniejszy, mezomery pośredni, a mikromery największy stosunek jądro-cytoplazmatyczny. Cytoplazma makromerów, poza organellami komórkowymi, zawiera granule elektronowo gęstego materiału i inkluduje lipidowe. Cytoplazma mezomerów posiada jedynie nieliczne krople lipidów, natomiast cytoplazma mikromerów wolna jest od wszelkiego rodzaju inkluzji charakteryzujących dwa wyżej wymienione typy blastomerów. Segregacja materiału wypełniającego cytoplazmę następuje w trakcie podziału makromerów. Makromery są wykluczane z udziału w dalszym formowaniu onkosfery natychmiast po ich podziale. Złanie się makromerów prowadzi do powstania syncytialnej otoczki zewnętrznej. W trakcie formowania tej otoczki onkosfery makromery migrują na jeden z biegunów embrionu, na skutek czego powstaje charakterystyczna „granica błoniasta” częściowo oddzielająca od siebie jądra makromerów.

Syncytialna warstwa otoczki wewnętrznej powstaje z fuzji trzech mezomerów i różnicuje się na trzy podwarstwy: bezjądrową warstwę ekstraembrioforną, embriofor w formie tzw. aparatu gruszkowatego i warstwę intraembrioforną, zawierającą jądra mezomerów.

Formowanie gęstego elektronowo embrioforu rozpoczyna się w pobliżu jąder mezomerów połączonych z dobrze rozwiniętym GER. Również formowanie rogów embriofornych i stożka aparatu gruszkowatego zachodzi w sąsiedztwie jąder mezomerów. Stożek embrioforalny powstaje w wyniku spiralnego skręcenia i złania rogów embriofornych.

Błonka onkosferyalna powstaje w wyniku delami-

nacji wewnętrznej warstwy otoczki wewnętrznej.

Dojrzała onkosfera osłaniana jest przez: (1) twardy płaszcz zewnętrzny, (2) otoczkę zewnętrzną, (3) trzy warstwy otoczki wewnętrznej, w tym twardym aparatem gruszkowatym i (4) delikatną błonką onkosfery.

Symetria dwuboczna przyszłej onkosfery zarysowuje się we wczesnych etapach rozwoju, jeszcze przed różnicowaniem komórek onkosfery. W miarę rozwoju zarodka, na skutek apoptozy części mikromerów, następuje stopniowa redukcja liczby komórek onkosfery.

Haki onkosfery powstają w sześciu onkoblastach, zlokalizowanych w przednim biegunie wczesnej preonkosfery, przed rozpoczęciem formowania gruczołu penetracyjnego. Natomiast różnicowanie gruczołu penetracyjnego następuje po rozpoczęciu procesu formowania haków i tegumentu.

Morfogeneza tegumentu onkosfery zachodzi w fazie preonkosfery. Powstaje on z dwujądrowego perykarionu, który początkowo znajduje się w przednim biegunie zarodka. Dalsze jego różnicowanie prowadzi do powstania na powierzchni larwy warstwy zewnętrznej cytoplazmy połączonej mostkiem cytoplazmatycznym z perykarionem tegumentu. Do warstwy zewnętrznej cytoplazmy otwierają się ramiona gruczołu penetracyjnego.

Napór rozwijających się haków onkosfery na początkowo jednolitą warstwę cytoplazmatyczną tegumentu prowadzi do jej rozwarstwienia na tzw. błonę rejonu hakowego i bogatą w wyrostki tegumentalne warstwę zewnętrznej cytoplazmy tegumentu.

Dojrzała onkosfera jest wyposażona w trzy pary haków, system mięśni haków i powierzchniową muskulaturę somatyczną, oraz składa się z 5 typów komórek: (1) dwujądrowego perykarionu tegumentu, (2) gruczołu penetracyjnego, (3) dwóch komórek nerwowych, (4) licznych komórek somatycznych stanowiących miocyty mięśni haków i muskulatury somatycznej oraz (5) dużych komórek germinatywnych. Tegument onkosfery pokrywa jedynie przedni biegun onkosfery, tzw. biegun hakowy. Komórki nerwowe są zlokalizowane w centralnej części onkosfery i posiadają długie wypustki, tj. neurony onkosfery, szczególnie dobrze widoczne w pobliżu mięśni haków i muskulatury somatycznej. Komórki germinatywne zlokalizowane są w tylnym biegunie onkosfery.

Niewielkie stężenia glikogenu notowano w makromerach i mezomerach, a następnie w otoczkach onkosfery. Obserwowano dużą koncentrację glikogenu w obrębie charakterystycznych granul makromerów. W trakcie różnicowania zarodka glikogen z otoczek przenikał do embrionu. Jednocześnie obserwowano znaczny wzrost ilości lipidów, początkowo w makromerach i otoczce zewnętrznej, a następnie w otoczce wewnętrznej. W późniejszych etapach rozwoju następował istotny spadek liczby kropli lipidowych, szczególnie w intraembriofoforalnej warstwie otoczki wewnętrznej. Świadczyć to może o energetycznym znaczeniu lipidów w rozwoju onkosfery.

Wpłynęło 12 grudnia 2006

Zaakceptowano 21 grudnia 2006