

DOI 10.23946/2500-0764-2018-3-2-20-27

УЛЬТРАСТРУКТУРА И ГИСТОХИМИЯ ЖЕЛТОЧНЫХ КЛЕТОК, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ РАЗВИТИЕ ЯИЦ ВОЗБУДИТЕЛЯ ОПИСТОРХОЗА

НАЧЕВА Л.В., ГРЕБЕНЩИКОВ В.М.

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Кемерово, Россия

ORIGINAL ARTICLE

ULTRASTRUCTURE AND HISTOCHEMISTRY OF VITELLOCYTES ENSURING THE DEVELOPMENT OF OPISTHORCHIS FELINEUS EGGS

LYUBOV V. NACHEVA, VALERIY M. GREBENSCHIKOV

Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056), Russian Federation

Резюме

Цель. Изучить гистохимию и ультраструктуру желточных клеток, обеспечивающих развитие яиц возбудителя описторхоза.

Материалы и методы. Материалом для работы служили трематоды *Opisthorchis felineus*, взятые при вскрытии кошек, спонтанно заражённых описторхозом. Гистохимические исследования проводили с помощью реакций: толуидиновый синий (при pH 4,2); бромфеноловый синий по Бонхеу и Кумаси, бриллиантовый синий G-250 на белки; проводили ферри-феррицианидный метод на SS- и SH-группы по Шевремону и Фредерику. Ставили реакцию по Фельгену на ДНК, ШИК-реакцию на гликоген и окрашивали Суданом чёрным-В на липидный компонент. Результаты изучали в световом микроскопе. Для электронной микроскопии свежий материал выдерживали 2 часа в глутаровом альдегиде на фосфатном буфере в соотношении 1:9 в течение 10 минут, затем оставляли в чистом фосфатном буфере на 5 минут, после чего фиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия. Фиксатор готовили на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,4). После дегидратации в серии спиртов восходящей концентрации кусочки заключили в аралгит. Срезы готовили на ультрамикротоме КВ-ОА. После контрастирования в 2% уранил-ацетате и цитрате свинца по

Рейнольдсу срезы изучали в электронном микроскопе ЭМВ-100В.

Результаты. Ультраструктура желточных клеток *Opisthorchis felineus* зависит от стадии вителлогенеза, в процессе которого секретируются вещества белково-липидного характера. В их состав входят основные белки, некоторые аминокислоты (аргинин, гистидин, лизин, фенилаланин, тирозин, триптофан), SS- и SH-группы, незначительное количество гликогеновых зерен и липоиды. Эти вещества участвуют в образовании желточных гранул и глобул разной величины, которые создают кластеры в расширенных каналах-цистернах эндоплазматической сети. Желточные глобулы необходимы для формирования оболочки яиц, выполняющей защитную функцию и обеспечивающей их сохранность во внешней среде.

Заключение. При изучении ультраструктуры и гистохимии установлено, что желточные клетки находятся на разных стадиях развития и в процессе вителлогенеза продуцируют желточные гранулы из белково-липидного комплекса, обеспечивающие создание оболочки и формирование яиц *Opisthorchis felineus*.

Ключевые слова: гистохимия, ультраструктура, желточные клетки, скорлуповые гранулы, *Opisthorchis felineus*.

Abstract

Aim. To study histochemistry and ultrastructure of vitellocytes providing the development of *Opisthorchis felineus* eggs.

Materials and Methods. *Opisthorchis felineus* eggs were collected from cats with opisthorchiasis. Tissue were examined utilizing toluidine blue and bromphenol blue for nuclei staining, and Coomassie brilliant blue G-250 for protein staining. We further conducted ferric ferricyanide test (Chevremont and Frederic) to identify sulfur-containing amino acids, Feulgen staining to detect DNA, periodic acid–Schiff staining for polysaccharides and mucosubstances, and Sudan Black B for lipids. Electron microscopic examination was carried out after ultrathin sectioning with the following staining with uranyl

acetate and counterstaining with lead citrate.

Results. Ultrastructure of *Opisthorchis felineus* vitellocytes was defined by the stage of vitellogenesis. Vitellocytes were positively stained for proteins, SS- and SH-containing amino acids, and also contained small amount of glycogen and lipids. These substances were involved in the formation of vitelline granules aggregating in clusters within the endoplasmic reticulum and representing precursors of vitelline membrane.

Conclusion. At sequential stages of their development, vitellocytes produce protein- and lipid-rich granules that ultimately constitute vitelline membrane of *Opisthorchis felineus* eggs.

Keywords: histochemistry, ultrastructure, vitellocytes, vitelline granules, vitellogenesis, *Opisthorchis felineus*.

◀ English

Введение

Изучение тонкой структуры желточных клеток, обеспечивающих морфофункциональные механизмы вителлогенеза паразита, может создать фундаментальную платформу в поиске новых антигельминтных препаратов для более эффективного использования в практике здравоохранения при лечении описторхоза человека.

О важности изучения у паразитов желточных клеток свидетельствуют исследования этого органа с разных сторон. Морфофункциональные особенности желточных фолликулов и их стадий развития были ранее описаны нами у трематод, вызывающих заболевания как у человека, так и у животных [1, 2]. Другими авторами обнаружены специфические факторы в желточных клетках и определены маркёры различных стадий в процессе их дифференцировки у *Schistosoma mansoni* [3]. Эти данные обеспечивают основу для будущих исследований по изучению молекулярной биологии этого важного органа паразита.

Микроскопический анализ, выполненный способом изоляции желточников из самок *Schistosoma mansoni*, показал характерные черты дифференциации желточных клеток, а цитологические и физиологические исследования продемонстрировали их жизнеспособность. В то же время исследователям удалось с помощью флуоресцентно-активированной сортировки осуществить разделение и улучшение дифференциации желточных клеток *in vitro* [4]. В целом эти результаты демонстрируют целе-

сообразность способа изоляции органов для получения вителлинового материала, необходимого для культивирования яиц паразитов и проведения дальнейших экспериментов и на других видах трематод.

Вителлогенез у трематод протекает в желточниках, способствуя образованию в желточных клетках скорлуповых гранул, необходимых для развития яиц паразита [5]. Этот желточный материал, с одной стороны, нужен для формирования оболочки яиц, а с другой – играет трофическую роль при созревании самой яйцеклетки [6].

Khampoosa P. et al. изучали эмбриогенез и развитие яиц у *Opisthorchis viverrini* с помощью световой и электронной микроскопии [7]. Авторами было показано участие желточных клеток в процессе образования яиц. При молекулярном и биохимическом изучении *Opisthorchis viverrini* установлено, что как в желточных клетках, так и в других железах половой системы обнаруживается кальретикулин – белок эндоплазматического ретикулума, цитоплазмы и клеточной мембраны, который принимает участие в регуляции сигнальной функции, связывает ионы кальция [8], обеспечивая его гомеостаз и фолдинг белков. Блокировка кальретикулина приводит к прекращению плодовитости.

Мы считаем, что эти данные могут послужить поиску антигельминтиков, направленных на разрушение белков желточных клеток паразита. Влияние празиквантела на морфологию *Opisthorchis felineus* и *Opisthorchis viverrini* было показано с помощью световой и флуорес-

центной микроскопии в эксперименте *in vivo* и *in vitro* [9].

Возбудитель описторхоза – *Opisthorchis felinus* в последние годы привлекает внимание с точки зрения изучения ультраструктуры его сперматозоидов, имеющих отношение к репродукции паразита [10].

Мы считаем, что исследования ультраструктуры и гистохимии органов женской половой системы описторхов в большей степени способствуют созданию фундаментальной базы данных для поиска новых антигельминтных средств, которые могут воздействовать на тонкие механизмы формирования яиц трематод, обеспечивая их репродуктивную стерилизацию.

Цель исследования

Изучить гистохимию и ультраструктуру желточных клеток, обеспечивающих развитие яиц возбудителя описторхоза.

Материалы и методы

Материалом для исследований были мариты *Opisthorchis felinus*, взятые из печени кошек, спонтанно заражённых описторхозом.

Гистохимические исследования проводили с помощью реакций: толуидиновый синий (при pH 4,2), бромфеноловый синий по Бонхегу, Кумасси бриллиантовый синий G-250. Реагент Брэдфорда, состоящий из красителя Кумасси G-250, метанола и фосфорной кислоты, традиционно используется для количественного определения белков [11, 12]. Использование этого реагента в анализе Брэдфорда основывается на связывании красителя Кумасси бриллиантовый синий G-250 с белками. Установлена способность красителя реагировать с небольшой группой аминокислот: аргинин, гистидин, лизин, фенилаланин, тирозин и триптофан [13]. Выявление белков в разных клетках паразита имеет большое значение для установления механизмов развития как репродуктивной системы, так и жизненного цикла паразита в целом [14].

Выполняли реакцию по Фельгену на ДНК и ШИК-реакцию по Мак-Манусу. Применяли ферри-феррицианидный метод для выявления SH-групп по Шевремону и Фредерику. Результаты изучали в световом микроскопе. Определение липидного компонента проводили окрашиванием Суданом чёрным В.

Электронно-микроскопические исследования проводили со свежим материалом, который

выдерживали 2 часа в глютаровом альдегиде на фосфатном буфере в соотношении 1:9 10 минут и оставляли в чистом фосфатном буфере на 5 минут, после чего фиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия. Фиксатор готовили на 0,1М фосфатном буфере (pH 7,4). После дегидратации в серии спиртов восходящей концентрации кусочки заключили в аралгит. Срезы готовили на ультрамикротоме КВ-ОА. После контрастирования в 2% уранил-ацетате и цитрате свинца по Рейнольдсу срезы изучали в электронном микроскопе ЭМВ-100В.

Результаты и обсуждение

Желточники *Opisthorchis felinus* представлены фолликулами гроздьевидной формы, каждый из которых окружен тонкой мембраной, относительно отделяющей их от паренхимы. Взаимодействие желточников с клетками внутренней среды паразита происходит через мембрану за счёт её избирательной проницаемости, которая обеспечивается присутствием гиалуроновой кислоты в мембране желточных фолликул. Свидетельством наличия этой кислоты в мембране является её метакроматическое окрашивание при реакции с толуидиновым синим (при pH 4,2).

Цитоархитектура желточников *Opisthorchis felinus* характеризуется тремя группами желточных клеток (вителлоцитов): недифференцированными клетками, имеющими плотное ядро и небольшой ободок цитоплазмы, располагающимися пристеночно, которые могут находиться на разных фазах деления митозом; базовыми (основными) или созревающими клетками, которые претерпевают период роста, на этой стадии в них начинается образование желточных или скорлуповых гранул; зрелыми клетками, цитоплазма которых заполнена большим количеством желточных гранул, эти клетки транспортируются в желточный проток. Желточные клетки находятся на разных стадиях развития (вителлогенеза) и соответственно имеют разные морфофункциональные особенности.

Гистохимические реакции показали, что наиболее интенсивное окрашивание ядер при реакции по Фельгену на ДНК определялось в желточных клетках недифференцированного типа, и в наименьшей степени окрашивались ядра зрелых клеток.

Установлено, что желточные клетки в целом окрашиваются бромфеноловым синим в голубой цвет, а гранулы – в зеленовато-голубой. Раз-

ное окрашивание свидетельствует о том, что в цитоплазме клеток содержатся суммарные белки, а в гранулах – основные протеины. При проведении ферри-феррицианидной реакции было показано, что желточные гранулы описторхов представлены основными белками, имеющими в своём составе SS- и SH-группы. Это было описано нами ранее при исследовании разных видов трематод, включая описторхов [15]. Мы считаем, что положительное окрашивание желточных гранул в реакции на SH-группы указывает на содержание в гранулах веществ, способствующих кератизации. Подобные высказывания сделаны другими авторами, которые также изучали сульфгидрильные группы белков по методу Шевремона и Фредерика, но на других объектах [16]. Наибольшее количество сульфгидрильных групп определяли в роговом слое, и SH-группы были распространены в основном диффузно или в виде мелкозернистой массы.

При окраске с Кумасси бриллиантовым синим G-250 желточные гранулы клеток желточников описторхов окрашиваются в коричневый цвет, что указывает на присутствие в них некоторых аминокислот – аргинина, гистидина, лизина, фенилаланина, тирозина и триптофана.

Желточные гранулы в клетках проявляли положительную реакцию с Суданом чёрным-B, что указывает на присутствие в них липоидного компонента.

При ШИК-реакции ярко-малиновое окрашивание обнаруживали в цитоплазме клеток, в стенке фолликулов и ячейках прилегающей к ним паренхимы. Гликоген в виде темно-фуксиновых гранул выявлялся преимущественно вокруг желточников, но незначительное количество мелких зёрен встречалось в цитоплазме желточных клеток. Наличие гликогена указывает на возможность автономного обеспечения энергетическим ресурсом клеток на всех стадиях вителлогенеза.

Гистохимические методы эффективны тем, что можно их экстраполировать для исследования патологии тканей после лечения антигельминтиками, но для этого следует сначала определить тканевую гистохимическую реактивность как паразита, так и хозяина до применения препарата. Эти методы являются чувствительными и могут использоваться для диагностики как степени зрелости той или иной клетки, так и определения её нормы или патологии.

Электронно-микроскопические исследования желточных клеток были изучены другими авторами у разных видов дигенетических трематод и

показано, что клетки находятся на разных стадиях развития и это можно определить по содержанию в них желточных глобул, которые, как и некоторое количество липидных капель, являются основными включениями, возникающими в результате вителлоцитарной синтетической активности [17, 18]. Некоторые авторы выделяют четыре или пять стадий вителлогенеза трематод, включая в этот процесс не только стадии развития самих желточных клеток, но и особенности ультраструктуры паренхимы, окружающей вителлоциты в желточниках [19, 20].

Проведенные нами исследования ультраструктуры желточных клеток *Opisthorchis felineus* подтвердили наши же данные световой микроскопии о наличии в желточных фолликулах клеток, находящихся на разных стадиях вителлогенеза. По своей citoархитектонике и ультраструктуре вителлоциты находятся на трёх стадиях развития. Поэтому мы будем описывать три группы этих клеток: незрелые (малодифференцированные), созревающие (основные) и зрелые вителлоциты.

Каждая желточная клетка окружена мембраной, которая инвагинирует внутрь цитоплазмы, образуя эндоплазматическую сеть (ЭПС) гранулярного типа. Ядро представлено конденсированным и диффузным хроматином и отчётливо контурируемой двойной ядерной мембраной – наружной и внутренней, или собственно ядерной. Между ними образуется перинуклеарное пространство. Наружная мембрана выпячивается в цитоплазму, и между ней и цитоплазмой определяется незначительная вакуолизация (**рисунок 1**). Отмечено, что по мере развития вителлоцитов наружная ядерная мембрана взаимосвязана с ЭПС, и взаимоотношения между клеточной мембраной и ядерной мембраной происходят через ЭПС, функционируя как система. Желточная клетка имеет овальную форму, а ядро, как правило, круглую, и клетки обладают выраженным ядерно-цитоплазматическим соотношением, которое меняется по мере их созревания. У незрелых желточных клеток объём цитоплазмы превышает объём ядра в два раза. При дальнейшем развитии желточных клеток мы наблюдали синхронное изменение их объёмов. Но уже в зрелой клетке, заполненной большим количеством желточного материала, определялось преобладание объема цитоплазмы.

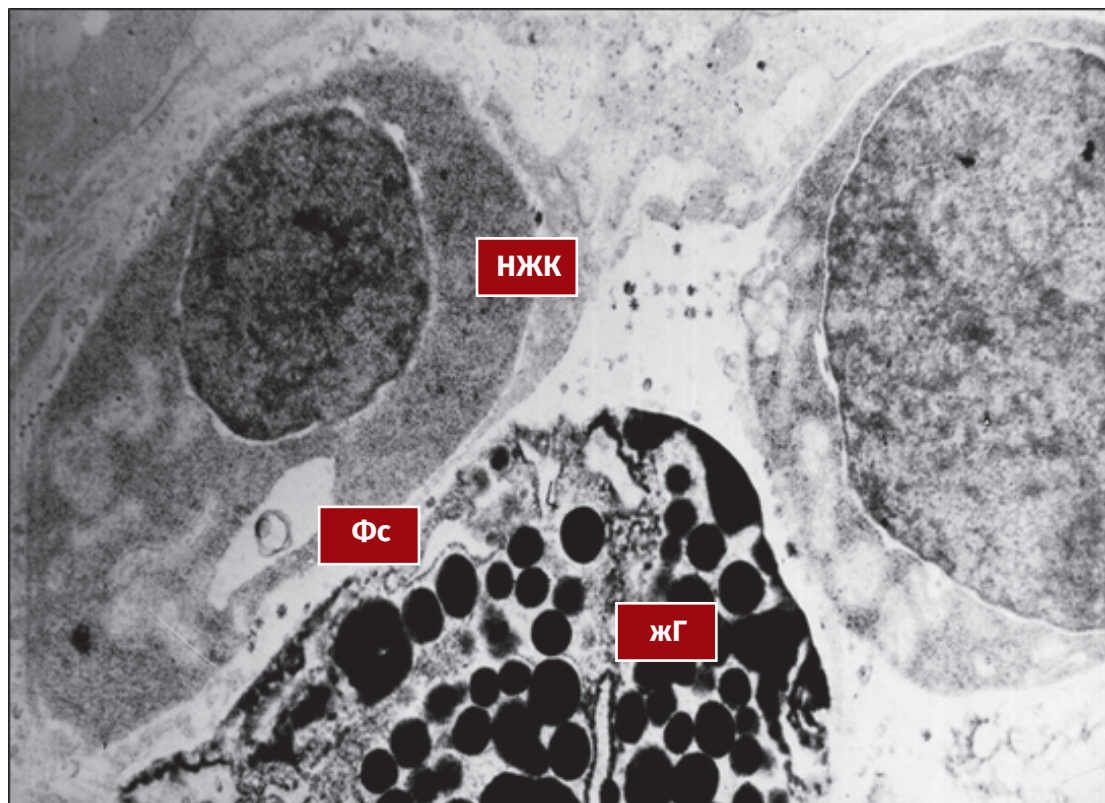
Малодифференцированные или незрелые вителлоциты, находящиеся на начальной ста-

Рисунок 1.

Желточные клетки *Opisthorchis felineus*. НЖК – незрелые желточные клетки с темным ядром, жГ – желточные гранулы зрелой желточной клетки, Фс – фагосома. Электронограмма. Ув. 18000. Окраска уранил-ацетат, цитрат свинца

Figure 1.

Vitellocytes of *Opisthorchis felineus*. Im-VC – immature vitelline cells with dark nucleus, vG – vitelline granules within the mature vitelloocyte, Phs – phagosome. Uranyl acetate staining with lead citrate counterstaining, x18000 magnification



дии вителлогенеза, имеют темное ядро, содержат много рибосом, митохондрий и каналов эндоплазматической сети (ЭПС).

Изредка встречаются фагосомы (рисунок 2). Комплекс Гольджи на электронограммах нам обнаружить не удалось.

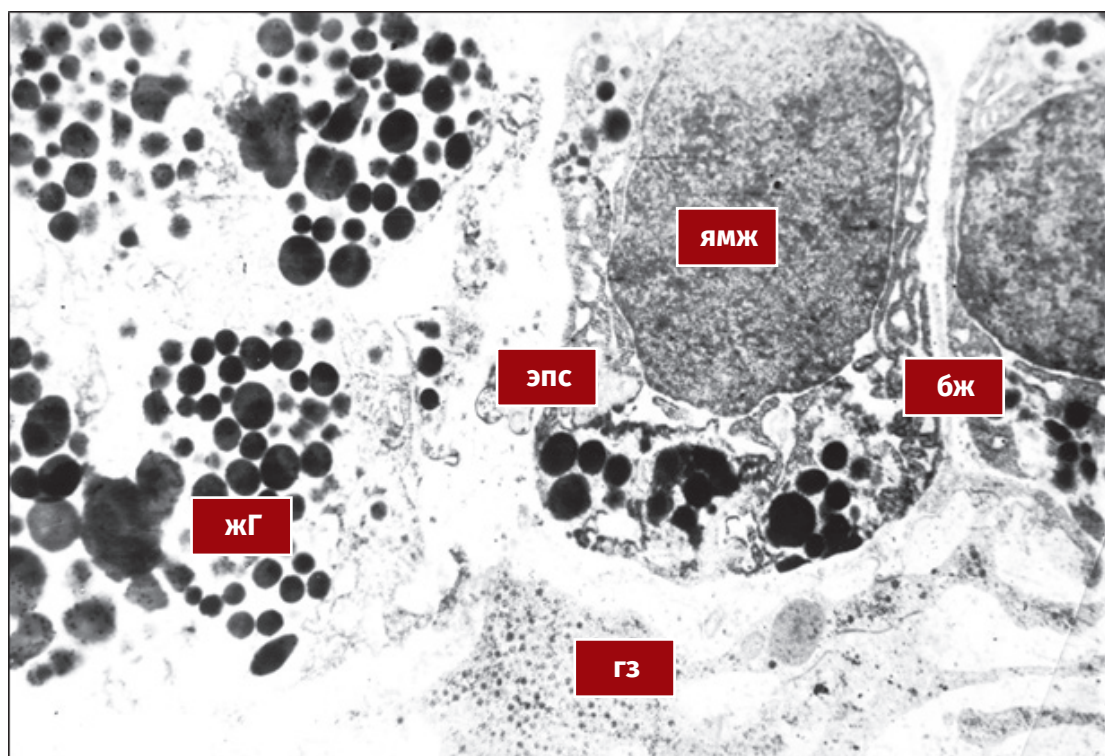
В созревающих вителлоцитах наблюдали мелкую вакуолизацию в ядре, разрыхление хроматина, в цитоплазме определялось расширение каналов ЭПС, вакуолизация, скопление округлых гранул небольшой величины. Секреция гранул связана с гранулярной ЭПС.

Рисунок 2.

Желточные клетки *Opisthorchis felineus* разной степени зрелости. бЖК – базовые, основные или созревающие желточные клетки, ЯМЖ – ядро желточной клетки, ЭПС – эндоплазматическая сеть, жГ – желточные глобулы разной величины в увеличенных цистернах ЭПС. Гз – гликогеновые зерна в паренхиме окружающей желточные клетки. Электронограмма. Ув. 18000. Окраска уранил-ацетат, цитрат свинца

Figure 2.

Vitellocytes of *Opisthorchis felineus* at different stages. bVC – basic or immature vitellocytes, nVC – nucleus, EPS – endoplasmic reticulum, vG – vitelline granules in the EPS. G – glycogen in parenchymal cells surrounding the yolk. Uranyl acetate staining with lead citrate counterstaining, x18000 magnification



За счёт секреции специальных белково-липидных веществ происходит образование и скопление желточных гранул, что ведёт к расширению каналов ЭПС, которые напоминают в этих местах цистерны. Желточный материал в виде гранул скапливается именно в цистернах ЭПС. Вителлогранулы тёмные, электронноплотные, образуют в цистернах ЭПС отдельные группы, обособленные мембраной. Большие по объёму скопления желточных гранул в группы следует именовать как кластеры (рисунок 2,3), а кана-

лы ЭПС в этой части – «цистерны». Цитоплазма желточных клеток за счёт большого количества желточных гранул увеличивается. Гранулярная поверхность ЭПС содержит рибосомы, которые обеспечивают синтез протеинов, образующих желточные гранулы. Белковая природа гранул подтверждена нами гистохимическими исследованиями на белки.

Между созревающими и зрелыми клетками в паренхиме желточных фолликул встречаются зерна гликогена (рисунок 3).

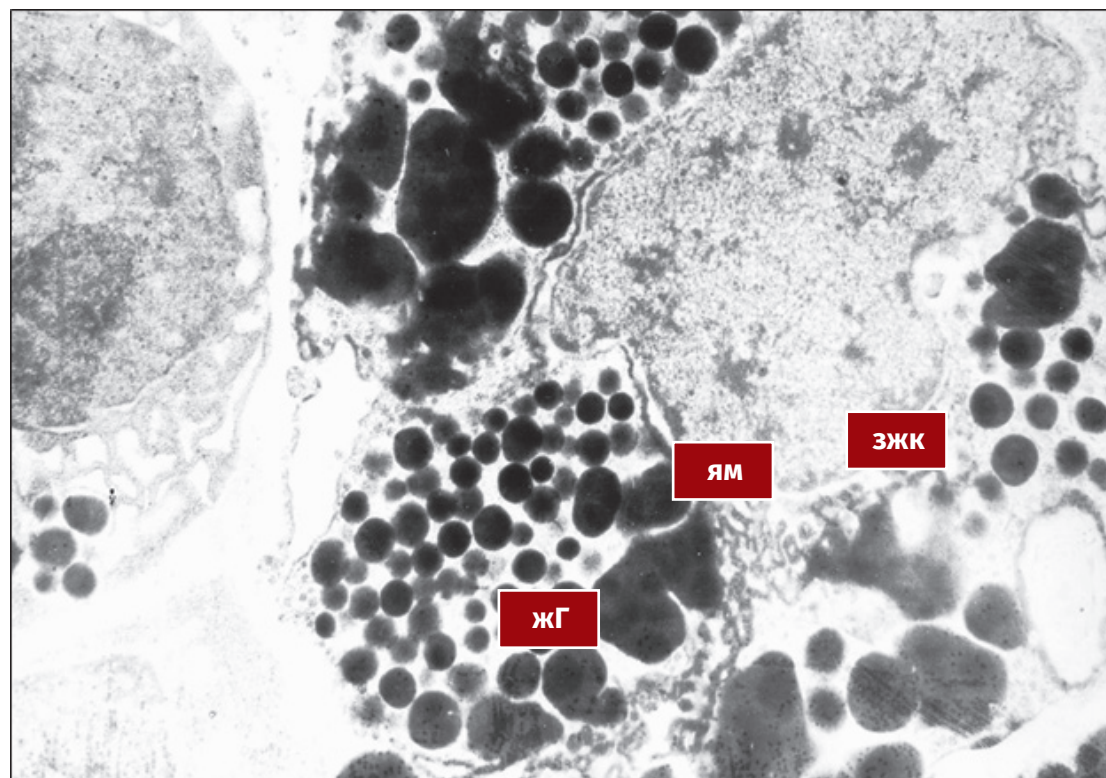


Рисунок 3.

Желточные клетки *Opisthorchis felineus*. ЗЖК – зрелая желточная клетка с ядром. ЖГ – желточные глобулы разной величины, ЯМ – ядерная мембрана. Электронограмма. Ув. 18000. Окраска уранил-ацетат, цитрат свинца

Figure 3.
Vitellocytes *Opisthorchis felineus*. mVC – mature vitellocytes with a nucleus (I). G – vitelline granules, EPS – endoplasmic reticulum, nM – nuclear membrane. Uranyl acetate staining with lead citrate counterstaining, x18000 magnification

Следующая стадия вителлогенеза характеризуется наличием зрелых желточных клеток (рисунок 3). В этих желточных кластерах, находящихся в цистернах ЭПС, обнаруживается много желточных гранул, и они имеют разные размеры, форму, и структуру.

По размерам гранулы можно разделить на мелкие, средние и крупные, но все они будут иметь круглую форму. Здесь же располагаются ещё гранулы-глобулы, которые имеют очень крупную, неправильную форму и напоминают конгломераты, в которых просматриваются мелкие гранулы, часто склеенные между собой. Глобулы, смешиваясь с липидными веществами, образуют белково-липидный комплекс и приобретают пластичность. Такие глобулы обычно светлые и напомина-

ют по структуре и форме крупные разреженные конгломераты. Этот материал поступает в желточный проток, затем в оотип и начальные отделы матки. Сюда же из тельца Мелиса выбрасывается секрет, который является пластификатором желточных конгломератов, обеспечивая их преобразование, что необходимо для создания защитной скорлуповой оболочки и формирования яиц описторхов в целом.

Ультраструктурные особенности желточных клеток показывают изменения их цитоархитектоники в процессе вителлогенеза, одним из заключительных фаз которого может быть распад желточных клеток. Встречаются клетки, которые можно обозначить как «перезревшие». Они характеризуются распадом ЭПС на отдель-

ные фрагменты, которые представлены максимально расширенными каналами, содержащими кластеры с крупными желточными конгломератами. Мембрана этих клеток не определяется, она лизирована. В этих полуразрушенных клетках нет разнообразия желточных гранул, в основном видны большие слившиеся глобулы или конгломераты.

Заключение

При изучении ультраструктуры и гистохимии установлено, что желточные клетки находятся на разных стадиях развития и в процессе вителлогенеза продуцируют желточные гранулы из белково-липидного комплекса, обеспечивающие создание оболочки и формирование яиц *Opisthorchis felineus*.

Литература / References:

1. Grebenshchikov V.M., Budantsov D.A. The functional morphology of trematode's vitelline glands. Russian Journal of Parasitology. 2011; (2): 6-9. Russian. (Гребенщиков В.М., Буданцов Д.А. Функциональная морфология желточников трематод // Российский паразитологический журнал. 2011. №2. С.6-9).
2. Nacheva LV, Grebenshchikov VM. Morphofunctional features of vitelline cells of trematodes suborder Paramphistomatata Fischoider, 1904. Russian Journal of Parasitology. 2009; (2): 24-26. Russian (Начева Л.В., Гребенщиков В.М. Морфофункциональные особенности желточников трематод подотряда Paramphistomatata Fischoider, 1904 // Российский паразитологический журнал. 2009. №2. С. 24-26).
3. Wang J, Collins JJ 3rd. Identification of new markers for the *Schistosoma mansoni* vitelline lineage. Int J Parasitol. 2016; 46(7): 405-410.
4. Lu Z, Quack T, Hahnel S, Gelmedin V, Pouokam E, Diener M, et al. Isolation, enrichment and primary characterisation of vitelline cells from *Schistosoma mansoni* obtained by the organ isolation method. 2015; 45(9-10): 663-672.
5. Świderski Z, Bakhoum AJ, Montoliu I, Feliu C, Gibson DI, Miquel J. Ultrastructural study of vitellogenesis in *Maritrema felii* (Digenea, Microphallidae). Parasitol Res. 2011; 109(6):1707-1714.
6. Greani S, Quilichini Y, Marchand B. Ultrastructural study of vitellogenesis and oogenesis of *Crepidostomum metoecus* (Digenea, Allocreadiidae), intestinal parasite of *Salmo trutta* (Pisces, Teleostei). Parasite. 2016; 23: 47.
7. Khamposu P, Jones MK, Lovas EM, Srisawangwong T, Laha T, Piratae S, et al. Light and electron microscopy observations of embryogenesis and egg development in the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini* (Platyhelminthes, Digenea). Parasitol Res. 2012; 110(2): 799-808.
8. Chaibangyang W, Geadkaew-Krenc A, Vichasri-Grans S, Tesana S, Grans R. Molecular and Biochemical Characterization of *Opisthorchis viverrini* Calreticulin. Korean J Parasitol. 2017; 55(6): 643-652.
9. Pakharukova MY, Shilov AG, Pirozhkova DS, Katokhin AV, Mordvinov VA. The first comprehensive study of praziquantel effects in vivo and in vitro on European liver fluke *Opisthorchis felineus* (Trematoda). Int J Antimicrob Agents. 2015; 46(1): 94-100.
10. Zhukova MV, Mordvinov VA, Kiseleva E. Ultrastructure of spermatozoa in the seminal receptacle of the liver fluke *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884). Parasitol Res. 2014; 113(3):1093-1101.
11. Pink M, Verma N, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S. CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. Electrophoresis. 2010; 31(4): 593-598.
12. Welinder C, Ekblad L. Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. J Proteome Res. 2011; 10(3): 1416-1419.
13. Brunelle E, Le AM, Huynh C, Wingfield K, Halámková L, Agudelo J, et al. Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye: An Application for Forensic Fingerprint Analysis. Anal Chem. 2017; 89(7): 4314-4319.
14. Martinez-Sernández V, Perteguer MJ, Mezo M, González-Warleta M, Gárate T, Valero MA, et al. Fasciola spp: Mapping of the MF6 epitope and antigenic analysis of the MF6p/HDM family of heme-binding proteins. PLoS One 2017; 12(11): e0188520.
15. Nacheva LV, Grebenshchikov VM. Histochemical studies of the trematodes vitelline gland // Proceedings of the Azerbaijan Zoological Society. 2013; 5(1): 167-170. Russian (Начева Л.В., Гребенщиков В.М. Гистохимические исследования желточников у трематод // Труды общества зоологов Азербайджана. 2013. Т. 5. №1. С. 167-170).
16. Glukhov AA, Frolov RN., Alekseeva NT, Andreev AA. The histochemical characteristic of recovery processes when wounds are healing // Fundamental Research. 2013; 7(1): 55-60. Russian (Глухов А.А., Фролов Р.Н., Алексеева Н.Т., Андреев А.А. Гистохимическая характеристика восстановительных процессов при заживлении ран // Фундаментальные исследования. 2013. № 7.1. С. 55-60).
17. Poddubnaya LG., Bruňanská M, Świderski Z, Gibson DI. Ultrastructure of the vitellarium in the digeneans *Phyllodistomum angulatum* (Plagiorchiida, Gorgoderidae) and *Azygia lucii* (Strigeida, Azygiidae). Acta Parasitol. 2012; 57(3): 235-246.
18. Poddubnaya LG, Zhokhov AE, Bruňanská M, Brázová T, Gibson DI. Ultrastructural characteristics of the vitellarium of *Brandesia turgida* (Brandes, 1888) (Digenea: Pleurogenidae) and an examination of the potential usefulness of such vitelline traits in digenean systematics. Helminthologia. 2013; 50(2): 119-126.
19. Greani S, Quilichini Y, Foata J, Greiman SE, Ndiaye PI, Tkach VV, et al. Vitellogenesis of the digenean *Plagiorchis elegans* (Rudolphi, 1802) (Plagiorchiida, Plagiorchiidae). Parasitol Int. 2014; 63(3): 537-543.
20. Greani S, Quilichini Y, Foata J, Marchand B. Ultrastructural study of vitellogenesis of *Aphallus tubarium* (Rudolphi, 1819) Poche, 1926 (Digenea: Cryptogonimidae), an intestinal parasite of *Dentex dentex* (Pisces: Teleostei). J Parasitol. 2012; 98(5): 938-943.

Сведения об авторах

Начева Любовь Васильевна, профессор, доктор биологических наук, заведующая кафедрой биологии с основами генетики и паразитологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Кемерово, Россия

Вклад в статью: разработка дизайна, выполнение электронно-микроскопических и гистохимических исследований, написание статьи.

Гребеников Валерий Михайлович, доцент, кандидат биологических наук, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Кемерово, Россия

Вклад в статью: выполнение световой микроскопии и гистохимических исследований, написание статьи.

Корреспонденцию адресовать:

Начева Любовь Васильевна,
ул. Ворошилова, д. 22а, г. Кемерово, 650056, Россия
E-mail: lubov.nacheva@yandex.ru

Authors

Prof. Lyubov V. Nacheva, Professor, MD, PhD, Head of the Department of Biology, Genetics and Parasitology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Contribution: conceived and designed the study; performed electron microscopy and histological examination; wrote the article.

Prof. Valeriy M. Grebenshikov, MD, PhD, Associate Professor, Department of Biology, Genetics and Parasitology, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Contribution: performed histological examination; wrote the article.

Corresponding author:

Prof. Lyubov V. Nacheva,
22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation
E-mail: lubov.nacheva@yandex.ru

Acknowledgements: There was no funding for this project.

Статья поступила: 3.03.18 г.

Принята к печати: 31.05.18 г.