

**ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЕРТОНИНА И
НЕЙРОПЕПТИДА В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ЦЕРКАРИЙ ТРЕМАТОД –
Metorchis bilis и *Sanguinicola armata***

Н.Б. ТЕРЕНИНА

доктор биологических наук

О.О. ТОЛСТЕНКОВ

кандидат биологических наук

Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН; e-mail: terenina_n@mail.ru

Нейромедиаторы – серотонин и нейропептид FMRFамид определены иммуноцитохимически в нервной системе двух видов церкарий – *Metorchis bilis* (Opisthorchidae) и *Sanguinicola armata* (Sanguinicolidae). Исследуемые нейромедиаторы обнаружены в центральных и периферических отделах нервной системы церкарий трематод. Приведен сравнительный анализ полученных результатов и данных литературы о наличии и распределении исследованных нейромедиаторов у церкарий трематод разных видов.

Ключевые слова: трематоды, церкарии, нервная система, нейромедиаторы, серотонин, нейропептиды.

В последние годы возросло число работ, посвященных исследованию нервно-мышечной системы свободноживущих личинок трематод гермафродитного поколения (2, 5–9). Показано наличие в нервной системы церкарий трематод таких нейрональных сигнальных веществ, как серотонин, нейропептиды, оксид азота и другие нейромедиаторы. Исследование нервной системы личиночных стадий трематод дает возможность проведения сравнительного морфофункционального анализа нервной системы личиночных стадий трематод различных биологических, морфологических и таксономических групп.

Целью работы было проведение иммуноцитохимического исследования серотонинергических и пептидергических (FMRFамидергических) компонентов нервной системы церкарий трематод представителей двух семейств – сем. Opisthorchidae Braun, 1901 – *Metorchis bilis* Braun, 1890 и сем. Sanguinicolidae Graff, 1907 – *Sanguinicola armata* Plenn, 1905.

Материалы и методы

Церкарии *M. bilis* и *S. armata* были получены из моллюска *Bithynia tentaculata* (Белоруссия). Материал фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 7,4) при 4 °С и затем сохраняли в 10%-ном растворе сахарозы, приготовленном на 0,1 М фосфатном буфере.

Локализацию серотонинергических и FMRFамидергических нервных структур определяли иммуноцитохимически в соответствии с методом Coops et al. [4]. Образцы инкубировали в первичной антисыворотке (Incstar, USA, в разведении 1 : 500) в течение пяти суток при температуре 4 °С; затем – во вторичной антисыворотке (FITC, DAKO, в разведении 1 : 50) в течение следующих пяти суток.

Для исследования взаимоотношения выявляемых нейромедиаторов с мышечными элементами одновременно проводили также окраску мышечных волокон, используя связанный с флуорофором фаллоидин. Для окраски мышц использовали TRITC (тетраметилпродамин изотиоцианат) меченый фаллоидин (в разведении 1 : 200) во влажной камере в течение одного часа в темноте при температуре 4 °С в соответствии с методом, описанным Wahlberg [10].

Препараты исследовали с помощью Leica TCS SP1 конфокального сканирующего лазерного микроскопа.

Результаты и обсуждение

Metorchis bilis. Длина церкарии 0,217–0,246, ширина 0,068–0,075 мм, длина хвоста 0,330–0,365, ширина 0,039 мм [1].

Мускулатура стенки тела церкарий представлена кольцевыми, продольными и диагональными мышечными волокнами (рис. 1, А, Б). Кольцевые мышцы очень тонкие и их размер менее 0,5 мкм, продольные мышечные волокна более толстые (0,6–0,8 мкм). Семь-восемь диагональных волокон с интервалом в 6–8 мкм расположены до уровня зачатка брюшной присоски. Их диаметр менее 0,5 мкм. Отмечены хорошо развитые радиальные мышцы ротовой присоски. Мышечные элементы хвоста представлены продольными и кольцевыми мышечными волокнами. Наряду с частыми кольцевыми волокнами в хвосте встречаются и более редко расположенные кольцевые мышцы, на расстоянии 14 мкм друг от друга.

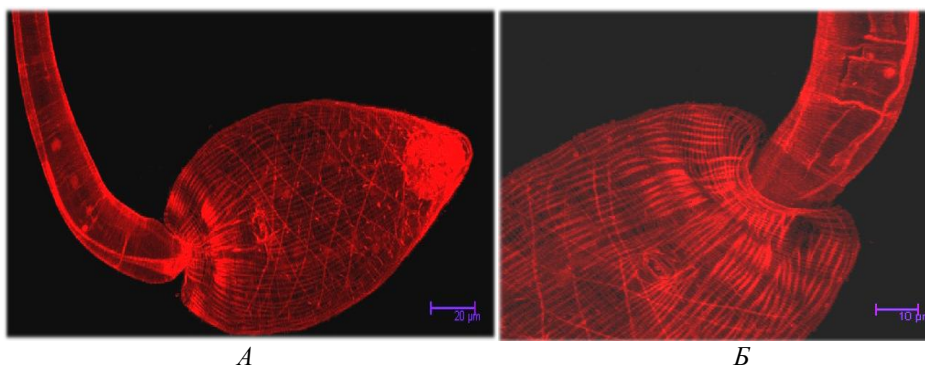


Рис. 1. Мышечные элементы (А, Б) церкарии *Metorchis bilis*, окрашенные TRITC меченым фаллоидином

Серотонин-иммунореактивные клетки и волокна выявлены в теле и хвосте церкарии (рис. 2). Пять серотонин-иммунореактивных клеток размером около 3 x 3 мкм обнаружены в области мозгового ганглия. От ганглиев к заднему концу тела проходят наиболее развитые главные продольные нервные стволы, по ходу которых с каждой стороны тела церкарии расположены по три иммунореактивные к серотонину клетки. Таким образом, с каждой стороны тела церкарии находится восемь серотонинергических клеток. К ротовой присоске от ганглиев идут тонкие волокна.

В первой трети хвоста церкарии выявлено две серотонинергические клетки диаметром 6 мкм. Немного впереди от этих клеток ближе к границе хвоста и тела обнаружено еще две мелкие иммунореактивные к серотонину структуры (диаметром 2 мкм). Вдоль хвоста прослеживаются два тонких серотонинергических волокна.

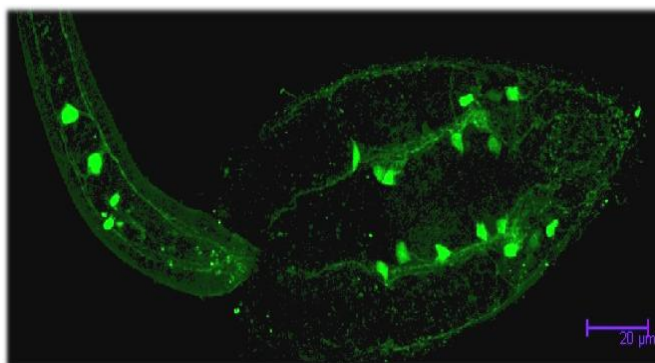


Рис. 2. Серотонин-иммунореактивные клетки и нервные волокна в нервной системе церкарии *M. bilis*

Иммунореактивность к нейропептиду FMRФамиду приведена на рисунке 3. Группа мелких FMRФамид иммунореактивных нервных клеток и волокон расположена симметрично с двух сторон от глотки и соединена кольцевой комиссурой. От этих структур в направлении к ротовой присоске идут два нервных волокна. Два наиболее мощных продольных нервных ствола, идущих вдоль тела к хвосту, соединены между собой комиссурами. На границе тела церкарии и хвоста наиболее четко выделяются две мелкие FMRФамид-иммунореактивные клетки. В области зачатка брюшной присоски с незначительным развитием мышечных волокон видны огибающие ее тонкие FMRФамидергические нервные волокна.

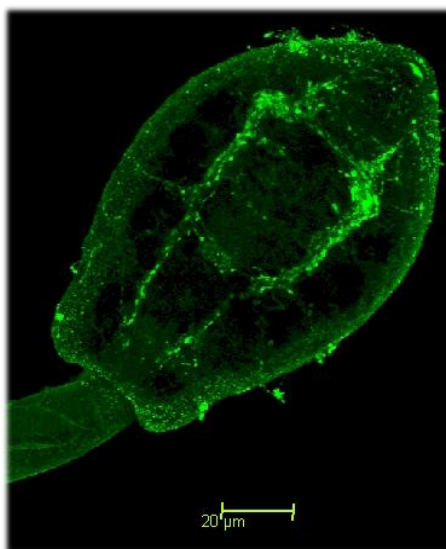


Рис. 3. FMRФамидергические компоненты в нервной системе церкарии *M. bilis*.

***Sanguinicola armata*.** Размер церкарии составляет 70–80 x 56 мкм. Хвост с относительно короткими фурками превосходит длину тела более, чем в три раза.

С каждой стороны тела церкарии обнаружено шесть серотонин-иммунореактивных клеток, три из которых расположены в области головных ганглиев, остальные три – в средней части тела по ходу главного продольного нервного ствола. Размер клеток около 4 x 4 мкм. Чуть выше головных ганглиев видны парные образования, имеющие положительную серотонин

иммунореактивную реакцию (рис. 4). Эти структуры соответствуют расположению грушевидных желез, описанных у этого вида церкарий [3].

В хвосте церкарии видны четыре серотонинергические волокна, по два с каждой стороны, которые простираются далее в фурки. В нижней части хвоста, до его разветвления, обнаружены две иммунореактивные к серотонину клетки размером 4 x 4 мкм, немного ниже четко видна еще одна клетка (рис. 4, А, Б), в верхней части хвоста – сеть серотонинергических волокон.

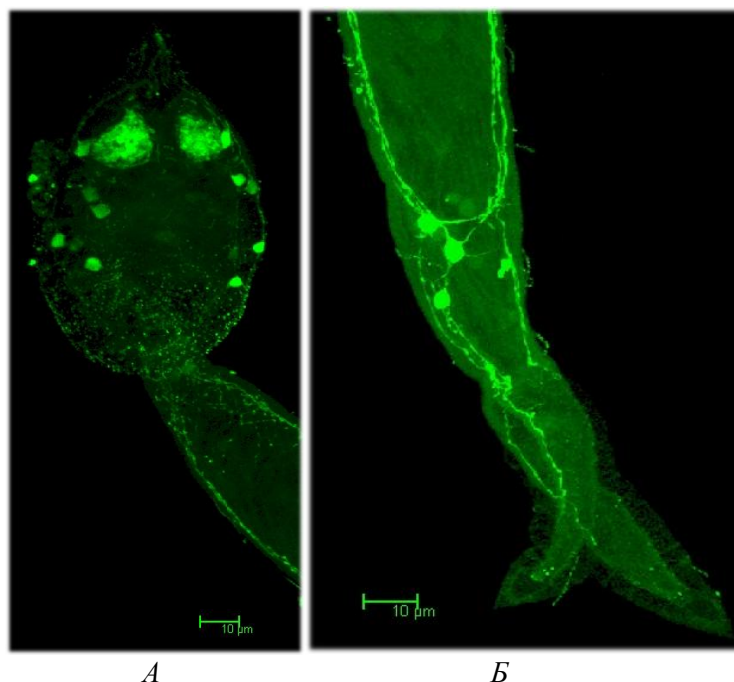


Рис. 4. Серотонин-иммунореактивные клетки в теле (А) и хвосте (Б) церкарии *S. armata*

FMRFамид иммунореактивные структуры у церкарии *S. armata* хорошо выражены (рис. 5). Иммунореактивность к нейропептиду обнаружена в головных ганглиях, головной комиссуре, волокнах, идущих к ротовой присоске, а также в продольных нервных стволах вдоль тела и комиссурах между ними. В хвосте церкарии FMRFамидергические волокна сходятся в его нижней части. На границе хвоста и тела видны две FMRFамидергические клетки.

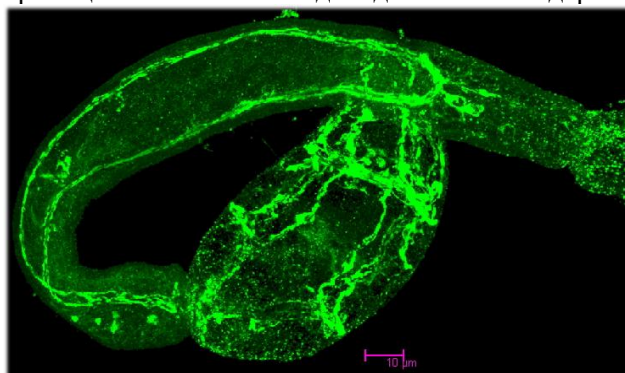


Рис. 5. FMRFамид иммунореактивные структуры в теле церкарии *S. armata*

Таким образом, в нервной системе двух видов церкарий, представителей различных семейств – сем. Opisthorchidae *M. bilis* и сем. Sanguinicolidae *S. armata* выявлены серотонинергические и пептидергические компоненты. Эти результаты согласуются с литературными данными в отношении церкарий трематод других видов [2, 5–9] и предполагают, что исследуемые нейромедиаторы принимают участие в регуляции различных функций свободноживущих личинок гермафродитного поколения трематод, включая активность мышечных элементов тела и хвоста, сенсорных органов и других функций.

Расположение нейрональных сигнальных веществ у исследованных церкарий сходен и связан с локализацией в центральных и периферических отделах нервной системы. Проведенные нами исследования церкарий *M. bilis* дают возможность сравнить полученные данные с результатами изучения другого представителя сем. Opisthorchidae – *Opisthorchis felineus* [2, 9]. Размеры мышечных волокон у исследованных церкарий сходен. Общее число серотонинергических нервных клеток с каждой стороны тела церкарий *O. felineus* и *M. bilis* равно восьми. Вместе с тем расположение этих клеток несколько отличается у исследованных видов. У *M. bilis* в области головного ганглия сгруппировано пять клеток, остальные три клетки располагались вдоль тела церкарии. В головных ганглиях церкарии *O. felineus* нами было отмечено три клетки, тогда как остальные пять располагались вдоль главного нервного ствола. Таким образом, при одном и том же общем числе серотонинергических клеток расположение их в теле представителей одного и того же семейства различалось.

Представляют интерес данные о наличии серотонинергических клеток в хвосте церкарий. Согласно литературным данным в хвосте большинства исследованных церкарий, включая *O. felineus*, обнаружено две серотонинергические клетки, которые расположены в начале, середине или, как у фуркоцеркарий, нижней части хвоста. В хвосте исследованной нами церкарии *M. bilis*, помимо двух серотонинергических клеток (размер которых примерно такой же, как у *O. felineus* и равен 6 мкм), обнаружено еще две клетки, расположенные недалеко от них. Таким образом, число серотонинергических нервных элементов в хвосте церкарий одного семейства может быть различным. Довольно сложно расположены серотонинергические элементы в хвосте церкарии другого исследованного нами представителя трематод – *S. armata*, где в нижней части хвоста до его разветвления на фурки также было выявлено более двух серотонинергических клеток. Число волокон, содержащих серотонин, в хвосте исследованных церкарий различно: два у *M. bilis* и четыре у *S. armata*.

Таким образом, анализ полученных нами результатов и литературных данных о наличии в нервной системе церкарий трематод серотонинергических и пептидергических компонентов свидетельствует о важном функциональном значении исследованных нейромедиаторов в жизнедеятельности свободноживущей личинки церкарий трематод различных биологических, морфологических и таксономических групп.

Работа поддержана грантами РФФИ № 12-04-01051-а, 12-04-01086-а, Президента РФ НШ-2706.2012.4, МК-811.2013.4

Литература

1. Бээр С.А. Биология возбудителя описторхоза. – М., 2005. – 336 с.
2. Теренина Н.Б., Густафссон М., Толстенков О.О., Сербина Е.Ф. *Opisthorchis felineus*: серотонинергические и пептидергические элементы в нервной системе церкарий, метацеркарий, взрослых форм // Матер. Междунар. конф. «Биоразнообразие и экология паразитов наземных и водных ценозов». – М., 2008. – С. 82–85.
3. Сендерский И.В., Добровольский А.А. Морфология и хетотаксия церкарии *Sanguinicola armata* (Trematoda: sanguinicolidae) // Паразитология. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 310–321.

4. Coons A.H., Leduc E.H., Connolly J.M. Studies of antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study for the hyperimmune rabbit // J. Exper. Med. – 1955. – V. 102. – P. 49–60.
5. Terenina N.B., Tolstenkov O., Fagerholm H.P. et al. The special relationship between the musculature and the NADPH-diaphorase activity of 5-HT and FMRF amide immunoreactivities in redia, cercaria and adult of *Echinoparyphium aconiatum* (Digenea) // Tissue Cell. – 2006. – V. 38, N. 2. – P. 151–157.
6. Tolstenkov O.O., Akimova L.N., Terenina N.B., Gustafsson M.K.S. The neuromuscular system in freshwater furcocercaria from Belarus. II Diplostomidae, Strigeidae and Cyathocotylidae // Parasitol. Res. – 2012. – V. 110, N. 2. – P. 583–592.
7. Pan J.Z., Halton W., Shaw C. et al. Serotonin and neuropeptide immunoreactivities in the intramolluscan stages of three marine trematode parasites // Parasitology. – 1994. – V. 80. – P. 388–395.
8. Šebelová S., Stewart M., Mousley A. et al. The musculature and associated innervation of adult and intramolluscan stages of *Echinostoma caproni* (Trematoda) visualized by confocal microscopy // Parasitol. Res. – 2004. – V. 93. – P. 196–206.
9. Tolstenkov O.O., Terenina N.B., Serbina E.A., Gustafsson M.K.S. The spatial relationship between the musculature and the 5-HT and FMRFamide immunoreactivities in cercaria, metacercaria and adult *Opisthorchis felineus* (Digenea) // Acta Parasitologica. – 2010. – V. 55, N. 2. – P. 123–132.
10. Wahlberg M.H. The distribution of F-actin during the development of *Diphyllbothrium dendriticum* (Cestoda) // Cell and Tissue Res. – 1998. – V. 291. – P. 561–570.

Immunocytochemical study of serotonin and neuropeptide in the nervous system of cercariae – *Metorchis bilis* and *Sanguinicola armata*

N.B. Terenina, O.O. Tolstenkov

Neurotransmitters serotonin and neuropeptide FMRFamide were visualised by immunocytochemically in the nervous system of two cercariae – *Metorchis bilis* (Opisthorchidae) and *Sanguinicola armata* (Sanguinicolidae). The investigated compounds were demonstrated in the central and peripheral nervous system of cercariae. The obtained results and literature data on the presence and distribution of the studied neurotransmitters in different representatives of cercariae are analyzed.

Keywords: trematodes, cercariae, nervous system, neuromediators, serotonin, neuropeptides.