УДК 591.69-438.15-512.22

АКТИВНОСТЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ ЭСТЕРАЗ В ГОМОГЕНАТАХ МОЛЛЮСКОВ LYMNAEA STAGNALIS И LYMNAEA TUMIDA (GASTROPODA: PULMONATA) ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ЦЕРКАРИЯМИ ТРЕМАТОД ECHINOPARYPHIUM ACONIATUM И MOLINIELLA ANCEPS (ECHINOSTOMATIDAE)

© Я. Л. Воронцова, Н. И. Юрлова, С. Н. Водяницкая, В. В. Глупов

Институт систематики и экологии животных СО РАН, Новосибирск
Поступила 06.06.2008

Проведен сравнительный анализ изменения эстеразной активности в гомогенатах тела моллюсков *Lymnaea stagnalis* и *L. tumida* различных размеров при индивидуальном заражении церкариями трематод *Echinoparyphium aconiatum* и/или *Moliniella anceps.* Активность неспецифических эстераз определяли спектрофотометрически. Обнаружено, что наибольший уровень эстеразной активности регистрируется в группе интактных моллюсков с высотой раковины 3—4 мм. Показано, что одиночная и смешанная инвазии моллюсков церкариями трематод *E. aconiatum* и *M. anceps* приводят к изменению активности неспецифических эстераз в тканях зараженных животных. Через 2 сут после заражения увеличивается эстеразная активность у зараженных моллюсков с высотой раковины 5—8 мм, тогда как через 26 сут возрастает активность эстераз в группе моллюсков с высотой раковины 2 мм как при одиночной, так и при смешанной инвазии. Снижение эстеразной активности у зараженных животных регистрируется только через 26 сут после инвазии *E. aconiatum* моллюсков *L. stagnalis* (3—4 мм) и *L. tumida* (4 мм). Показано, что на изменение эстеразной активности влияет размера хозяина и вид паразита.

Пресноводные брюхоногие моллюски являются облигатными промежуточными и дополнительными (вторыми промежуточными) хозяевами для многих видов трематод. Личинки трематод локализуются в пищеварительной железе, в репродуктивных органах, в мантии, легких, мускулатуре ноги и др. (Гинецинская, 1968; Юрлова, 2003; Yurlova et al., 2006), вызывая нарушения в тканях инвазированных органов (Гинецинская, 1968; de Jong-Brink, 1997). Спороцисты, редии, церкарии и метацеркарии паразита оказывают многообразное воздействие на организм моллюска-хозяина. Не вызывая непосредственной его гибели, они могут влиять на иммунную систему, метаболизм, водный и ионный баланс, поведение, рост и репродукцию хозяина (Гинецинская, 1968; Grews, Esh, 1987; Hurd, 1990; Lee et al., 1994; Юрлова и др., 2000). В процессе существования системы «моллюск—трематоды» у хозяев формируются механизмы внутренней защиты, которые способствуют образованию у паразитов механизмов устойчивости

(Юрлова и др., 2000; Яковлева и др., 2001; Атаев, Полевщиков, 2004; Атаев и др., 2005). При развитии паразита в тканях-мишенях хозяина может вырабатываться большое количество различных веществ (эндобиотиков хозяина и метаболитов паразита), которые нарушают нормальное функционирование и развитие. Соответственно в организме хозяина активируются физиологические системы, направленные на элиминацию этих продуктов. Ключевую роль в данных процессах играют детоксицирующие ферменты, в частности неспецифические эстеразы.

Эстеразы выполняют ряд важных функций в организме беспозвоночных животных, в том числе и моллюсков: они осуществляют катаболизм эфиров высших жирных кислот, мобилизацию липидов, деградацию метаболических инертных эфиров, в том числе и разнообразных ксенобиотиков (Liska, 1998; Coeurdassier et al., 2002), участвуют в процессах репродукции (Mikhailov et al., 1997). Широкая субстратная специфичность свидетельствует об исключительной роли эстераз в деградации токсинов различного происхождения. В частности установлено, что неспецифические эстеразы участвуют в процессах метаболизма и детоксикации фосфорорганических соединений, пиретроидов, карбаматов (Galloway et al., 2002; Sogorb, Vilanova, 2002; Wang et al., 2006). В связи с этим проводятся исследования, в которых моллюски выступают в роли биоиндикаторов загрязнения окружающей среды, поскольку показана зависимость между активностью неспецифических эстераз в гемолимфе и гомогенатах тканей моллюсков и содержанием химических соединений в среде обитания животных (Galloway et al., 2002; Vioque-Fernandez et al., 2006; Wang et al., 2006). Необходимо отметить, что эстеразная активность у моллюсков может изменяться под воздействием таких факторов, как пища, климатические условия, возраст животных (Jordaens et al., 1999). Кроме того, на активность неспецифических эстераз могут оказывать влияние различные инвазии. Так, у моллюсков *Lymnaea truncatula* зарегистрировано увеличение активности эстераз в пищеварительной железе после заражения трематодой *Fasciola hepatica* (Humiczewska, Rajski, 2005). В гемоцитах двух линий моллюсков *Biomphalaria glabrata* (устойчивых и восприимчивых к *Schistosoma mansoni*) была обнаружена положительная реакция на неспецифические эстеразы. При этом показано, что активность фермента у особей, устойчивых к паразиту, уменьшается через 12 ч после заражения (Granath, Yoshino, 1983). К сожалению, сведения о влиянии трематод на изменение эстеразной активности у моллюсков исчерпываются перечисленными исследованиями. Более того в указанных работах анализируется влияние паразитирования партеногенетических личинок трематод на изменение эстеразной активности у моллюсков. Отсутствуют работы, посвященные изучению влияния паразитирования метацеркарий трематод на эстеразную активность моллюсков-хозяев, тем более при заражении разными видами трематод и с учетом размера хозяина.

Настоящее исследование ставит своей целью определить изменение активности неспецифических эстераз у моллюсков *L. stagnalis* и *L. tumida*, инвазированных церкариями трематод *E. aconiatum* и *M. anceps* при различных режимах заражения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследований служили моллюски *Lymnaea stagnalis* и *Lymnaea tumida* (Gastropoda: Pulmonata), а также церкарии трематод сем. Echinostomatidae: *Echinoparyphium aconiatum*, вышедшие из 2 особей

L. stagnalis (высота раковины 45 и 50 мм), и церкарии *Moliniella anceps,* вышедшие из *L. stagnalis* (высота раковины 48 мм) (русло р. Каргат, бассейн оз. Чаны).

Для экспериментов использовали молодь, которую получали в лаборатории из кладок моллюсков, собранных в июне—июле в прибрежной зоне р. Каргат. Исследования проводили на моллюсках *L. stagnalis* 4 размерных групп: высота раковины до 2 мм, 3—4 мм, 5—6 и 7—8 мм. Моллюски *L. tumida* имели высоту раковины 4 мм.

Экспериментальное заражение моллюсков. Для заражения использовали церкарий, вышедших из моллюсков в течение 30—40 мин. Молодь моллюсков заражали в микроаквариумах объемом 2 мл с круглым дном. В каждый микроаквариум помещали по 1 активному моллюску и от 2 до 15 активных церкарий (в зависимости от варианта). Микроаквариумы просматривали каждые 30 мин с целью проверки проникновения церкарий в моллюсков. При этом регистрировали число оставшихся церкарий и число хвостов. Наличие свободных хвостов церкарий рассматривали как свидетельство проникновения церкария в моллюска. В случае отсутствия церкарий в микроаквариумах предполагалось, что они проникли в моллюсков, и последних переносили в общий аквариум. Экспозиция моллюсков с церкариями продолжалось 2—3 ч. Моллюски каждой размерной группы были заражены церкариями 1 (*E. aconiatum* или *M. anceps*) или 2 (поочередное заражение *E. aconiatum* и *M. anceps*) видов трематод. После заражения моллюски содержались в аквариуме с профильтрованной речной водой.

Приживаемость метацеркарий контролировали через 2 и 26 сут после заражения. Гельминтологическое исследование моллюсков проводили компрессорным методом; прижившихся метацеркарий подсчитывали под бинокулярной лупой МБС-10 при 16х увеличении.

Для приготовления гомогената внутренних органов тело моллюска извлекали из раковины и помещали в холодный 0.1 М Na-фосфатный буфер (pH 7.2) (ФБ) в соотношении 0.06 г ткани на 1 мл буфера. Ткани гомогенизировали в течение 10 с, используя ультразвуковой гомогенизатор. Затем гомогенаты центрифугировали при 4 °С в течение 15 мин при 10 000 *g*. Полученный супернатант использовали для определения ферментативной активности.

Спектрофотометрическое определение активности эстераз в гомогенатах тканей контрольных и зараженных трематодами моллюсков проводили по Асперену (Asperen, 1962) с незначительными изменениями. Инкубационная смесь содержала 1 мл 0.54 мМ 1-нафтилацетата в ФБ и 15 мкл опытного образца. После инкубации в темноте в течение 30 мин при 30 °С реакцию останавливали путем добавления 0.25 мл красяще-фиксирующего раствора (0.25 % прочного синего РР и 3.125 % додецилсульфата натрия в ФБ). Удельную активность фермента выражали в единицах изменения оптической плотности (A_{600}) инкубационной смеси в ходе реакции в расчете на 1 мин и 1 мг белка.

Концентрацию белка в гомогенатах тканей определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976). Для построения калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин.

Полученные данные обрабатывали статистически, рассчитывая среднее арифметическое и его ошибку. Достоверность различий определяли по t-критерию Стъюдента ($p < 0.05$) (Плохинский, 1970).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспериментальное заражение. Через 2 и 26 сут после заражения *L. stagnalis* церкариями трематод был проведен гельминтологический анализ, позволяющий определить приживаемость паразитов в моллюсках. При одиночной инвазии через 2 сут после заражения приживаемость метацеркарий *M. anceps* в организме *L. stagnalis* с высотой раковины 2 и 7—8 мм была соответственно в 1.8 ± 0.78 и в 1.8 ± 0.72 раза меньше, чем в случае заражения церкариями *E. aconiatum* (табл. 1). При смешанной инвазии приживаемость церкарий обоих видов (*E. aconiatum* и *M. anceps*) была идентична во всех группах моллюсков, за исключением особей с высотой раковины 5—6 мм (табл. 1). Через 2 сут после заражения моллюсков *L. tumida* церкариями *E. aconiatum* обнаружено, что уровень приживаемости составил 17.5 % ± 7.51.

Через 26 сут после заражения в группе моллюсков *L. stagnalis* с высотой раковины 2 мм приживаемость церкарий *E. aconiatum* в случае одиночной инвазии составляла 12.0 % ± 8.01, что оказалось в 5.2 ± 1.08 раза меньше, чем через 2 сут после заражения. При одиночной инвазии церкариями *M. anceps* через 26 сут после заражения приживаемость церкарий в моллюсках составляла 14.29 % ± 9.93, что было в 2.3 ± 1.12 раза ниже, чем через 2 сут после заражения. При смешанной инвазии приживаемость церкарий

Таблица 1
Приживаемость (%) метацеркарий трематод *E. aconiatum* и *M. anceps* в моллюсках *L. stagnalis* через 2 сут после заражения

Table 1. Survivability (%) of the *E. aconiatum* and *M. anceps* metacercariae in *L. stagnalis* at 2 days post invasion

Высота раковины моллюска, мм	Одиночня инвазия					
	E. aconiatum			*M. anceps*		
	Приживаемость метацеркарий, %	n	N	Приживаемость метацеркарий, %	n	N
2	62.0 ± 8.67	5	10	36.5 ± 6.03	3	10
3—4	57.5 ± 12.21	10	10	56.0 ± 23.15	5	10
5—6	52.5 ± 13.76	10	4	0	5	4
7—8	62.6 ± 8.56	15	10	44.0 ± 11.46	10	10
	Смешанная инвазия					
	E. aconiatum			*M. anceps*		
	Приживаемость метацеркарий, %	n	N	Приживаемость метацеркарий, %	n	
2	36.5 ± 6.03	3	10	34.96 ± 11.05	2	
3—4	56.0 ± 23.15	5	5	53.4 ± 22.61	3	
5—6	0	5	4	25.0 ± 16.01	3	
7—8	44.0 ± 11.46	10	10	46.0 ± 13.01	5	

Примечание. N — количество заражаемых моллюсков; n — количество, церкарий, использованных для заражения одного молююска.

Таблица 2

Смертность (%) моллюсков *L. stagnalis* с высотой раковины 2 мм после заражения церкариями трематод *E. acoiatum* и *M. anceps*

Table 2. The mortality (%) of *L. stagnalis* snails (2 mm shell size) under invasion with the cercariae of *E. aconiatum* and *M. anceps*

Время после заражения	Одиночная инвазия		Смешанная инвазия *E. aconiatum* + *M. anceps*
	E. aconiatum	*M. anceps*	
2 сут (N = 10)	0	0	0
26 сут (N = 10)	50	30	50
Контроль (N = 10)	0	0	0

E. aconiatum через 26 сут после заражения составила 46.8 ± 13.42 %, тогда как церкарии *M. anceps* не были обнаружены в этом варианте при гельминтологическом анализе.

Смертность хозяина после заражения церкариями трематод была зафиксирована только среди моллюсков с высотой раковины 2 мм через 26 сут после инвазии (табл. 2), в остальных вариантах гибель моллюсков не наблюдалась.

Активность эстераз в гомогенатах нативных моллюсков *L. stagnalis* с различной высотой раковины. Мы предположили, что эстеразная активность в гомогенатах моллюсков может изменяться в зависимости от размера особей, поэтому был проведен анализ изменения активности фермента в группах нативных моллюсков *L. stagnalis* с различной высотой раковины. В результате выявлено, что наибольшая активность эстераз регистрируется в группе моллюсков высотой 3—4 мм. Эстеразная активность у моллюсков с высотой раковины 5—6 мм достоверно не отличается от таковой у особей высотой 7—8 мм (рис. 1).

Эстеразная активность в гомогенатах зараженных моллюсков *L. stagnalis* с различной высотой раковины через 2 сут после инвазии. В результате проведенных исследований было выявлено, что у моллюсков с высотой раковины 2 мм активность эстераз в варианте с заражением церкариями *M. anceps* была выше в 1.98 раза по сравнению с интактными особями. Активность

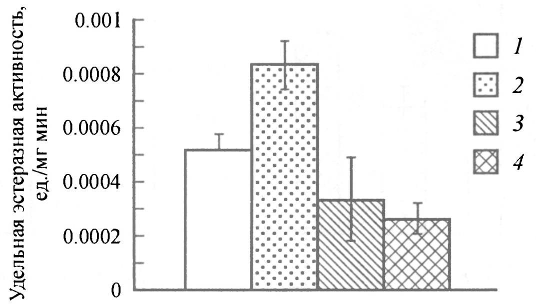

Рис. 1. Эстеразная активность в гомогенатах нативных моллюсков *L. stagnalis* с различной высотой раковины.

1 — высота раковины 2 мм, *2* — 3—4 мм, *3* — 5—6 мм, *4* — 7—8 мм.

Fig. 1. Esterase activity in the homogenates of noninfected *L. stagnalis* in relat shell size.

фермента в гомогенатах моллюсков, зараженных *E. aconiatum* и при смешанном заражении (*M. anceps* + *E. aconiatum*) достоверно не отличалась от контроля. В то же время эстеразная активность моллюсков, зараженных *M. anceps* была в 1.7 раза выше по сравнению с особями, зараженными церкариями *E. aconiatum* (рис. 2, *а*).

Анализ эстеразной активности в гомогенатах моллюсков с высотой раковины 3—4 мм показал, что достоверные отличия от контроля регистрируются только в варианте смешанного заражения. В этом случае через 2 сут после заражения активность фермента увеличивалась в 1.5 раза по сравнению с интактными особями (рис. 2, *б*).

Эстеразная активность в гомогенатах *L. stagnalis* с высотой раковины 5—6 мм была в 7.2 раза выше, чем в контроле через 2 сут после заражения моллюсков церкариями *E. aconiatum*, в 5.7 раза — после заражения *M. anceps* и в 4.8 раза при смешанном заражении (рис. 2, *в*).

Активность неспецифических эстераз в гомогенатах моллюсков с высотой раковины 7—8 мм через 2 сут после заражения увеличивалась во всех вариантах по сравнению с интактными особями. При этом смешанное заражение вызывало повышение активности фермента в 6.6 раза, заражение церкариями *E. aconiatum* и *M. anceps* — в 7.5 и в 5.5 раза соответственно (рис. 2, *г*).

Динамика активности неспецифических эстераз в гомогенатах моллюсков *L. stagnalis* при заражении трематодами. Эстеразную активность в динамике через 2 и 26 сут после заражения регистрировали в группах особей

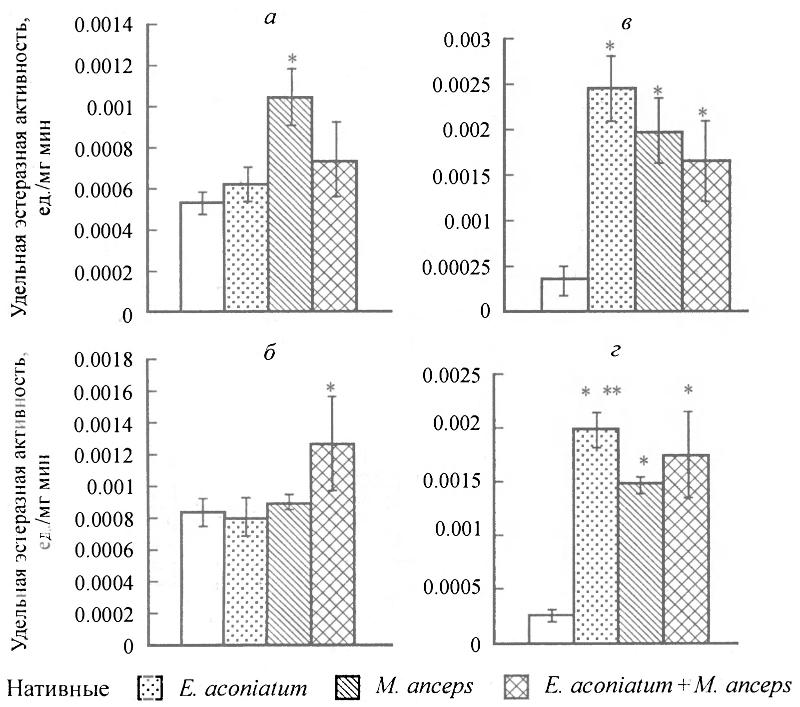

Рис. 2. Эстеразная активность в гомогенатах моллюсков *L. stagnalis* через 2 сут после заражения церкариями трематод.

а — высота раковины 2 мм, *б* — 3—4 мм, *в* — 5—6 мм, *г* — 7—8 мм. * — достоверное отличие от нативных моллюсков ($P < 0.05$); ** — достоверное отличие от моллюсков, зараженых *M. anceps* ($P < 0.05$).

Fig. 2. Esterase activity in the homogenates of *L. stagnalis* at 2 days post trematode invasion.

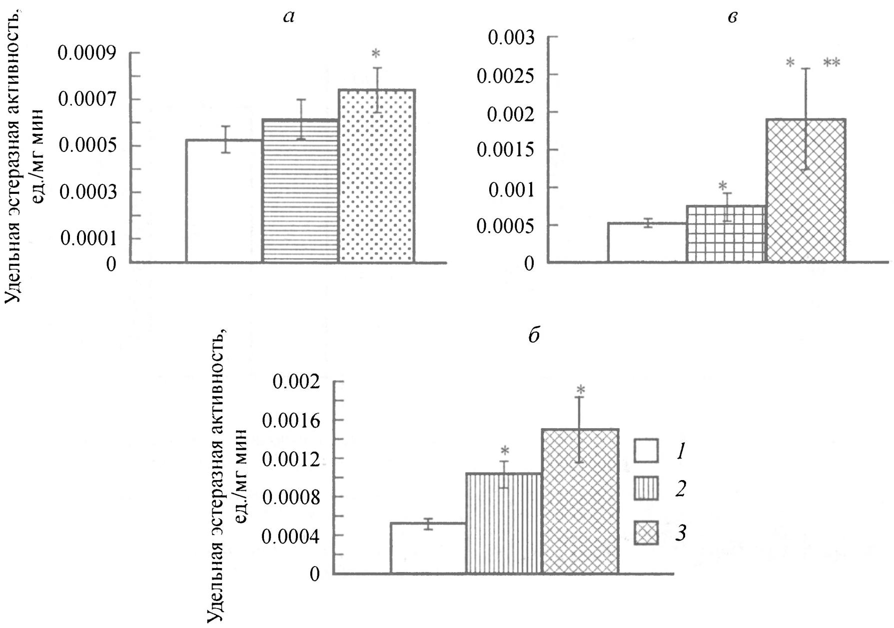

Рис. 3. Динамика эстеразной активности в гомогенатах моллюсков *L. stagnalis* (высота раковины 2 мм) при заражении церкариями трематод.

а — заражение *E. aconiatum*, *б* — заражение *M. anceps*, *в* — смешанное заражение (*E. aconiatum* + *M. anceps*). *1* — нативные, *2* — через 2 сут после заражения, *3* — через 26 сут после заражения. * — достоверное отличие от нативных моллюсков (P < 0.05); ** — достоверное отличие от моллюсков через 2 сут после заражения (P < 0.05).

Fig. 3. Alteration of the esterase activity in the homogenates of *L. stagnalis* (2 mm shell size) under trematode invasion.

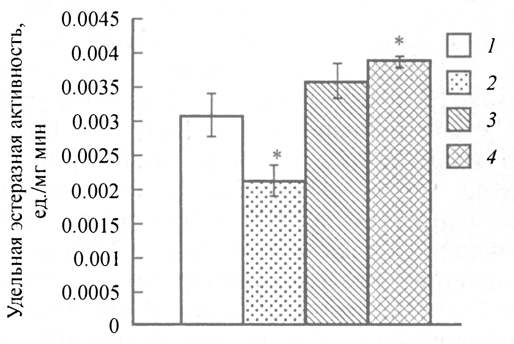

Рис. 4. Изменение эстеразной активности в гомогенатах моллюсков *L. stagnalis* (высота раковины 3—4 мм) через 26 сут после заражения трематодами.

1 — нативные, *2* — заражение *E. aconiatum*, *3* — заражение *M. anceps*, *4* — *E. aconiatum* + *M. anceps*. * — достоверное отличие от нативных моллюсков (P < 0.05).

Fig. 4. Alteration of the esterase activity in the homogenates of *L. stagnalis* (2 mm shell size) at 26 days post trematode invasion.

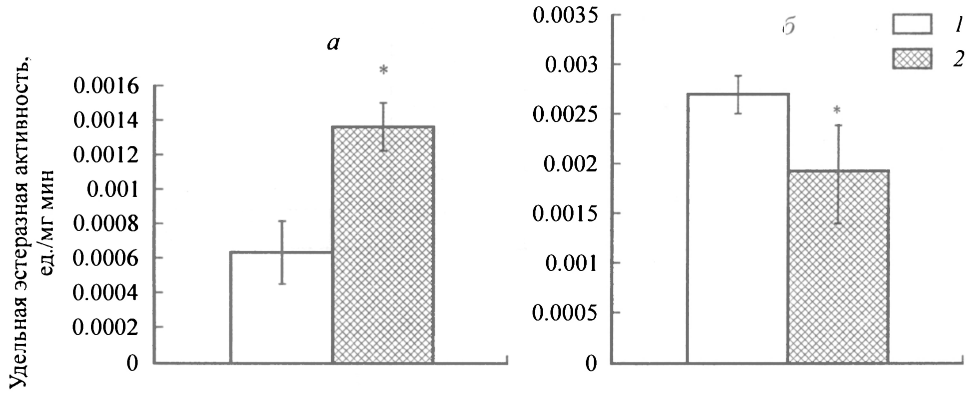

Рис. 5. Динамика эстеразной активности в гомогенатах моллюсков *L. tumida* (высота раковины 4 мм) при заражении церкариями трематоды *E. aconiatum*.

а — через 2 сут после заражения, *б* — через 26 сут после заражения. *1* — контроль, *2* — зараженные моллюски. * — достоверное отличие от контроля ($P < 0.05$).

Fig. 5. Alteration of the esterase activity in the homogenates of *L. tumida* (4 mm shell size) infected with *E. aconiatum* cercariae.

с высотой раковины 2 и 3—4 мм. Активность эстераз у моллюсков высотой 2 мм, зараженных *E. aconiatum* через 2 сут после заражения достоверно не отличалась от контроля, однако через 26 сут ферментативная активность возрастала в 1.4 раза по сравнению с интактными особями (рис. 3, *а*). При заражении моллюсков церкариями *M. anceps* зарегистрировано увеличение эстеразной активности в 1.9 раза через 2 сут после заражения и в 2.9 раза через 26 сут (рис. 3, *б*). Активность неспецифических эстераз у моллюсков, зараженных одновременно церкариями *E. aconiatum* и *M. anceps*, оказалась достоверно выше контроля в 3.6 раза только через 26 сут после заражения (рис. 3, *в*).

Активность эстераз у моллюсков с высотой раковины 3—4 мм достоверно не отличалась от контроля через 2 сут после заражения как церкариями *E. aconiatum*, так и *M. anceps* (рис. 2, *б*). Через 26 сут после заражения эстеразная активность особей, зараженных *E. aconiatum* достоверно снижалась в 1.4 раза по сравнению с интактными особями. В варианте с одновременным заражением 2 видами трематод активность фермента у зараженных моллюсков возрастала в 1.3 раза по сравнению с контролем (рис. 4). Эстеразная активность моллюсков, зараженных *M. anceps*, достоверно не отличалась от активности нативных особей на протяжении всего эксперимента (рис. 2, *б*, 4).

Изменение эстеразной активности в гомогенатах моллюсков *L. tumida* при заражении церкариями *E. aconiatum*. Через 2 сут после заражения зарегистрировали увеличение уровня активности неспецифических эстераз в 2.2 раза по сравнению с контролем. Через 26 сут после заражения моллюсков, напротив, обнаружили достоверное снижение активности эстераз в 1.4 раза по сравнению с интактными особями (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Пресноводные моллюски *L. stagnalis* и *L. tumida* являются вторыми промежуточными хозяевами для 18 видов трематод, в числе которых представители сем. Echinostomatidae — *E. aconiatum* и *M. anceps* (Юрлова, 2003; Юрлова, Сербина, 2004; Yurlova et al., 2006). С момента проникновения церкарий в хозяина до инцистирования проходит несколько часов, а через 6—7 сут завершается развитие метацеркарий, которые сохраняются в моллюске до тех пор, пока он не будет съеден окончательным хозяином (Юрлова и др., 2000; Yurlova et al., 2006). Проникновение церкарий в моллюска сопровождается механическим разрушением тканей хозяина, а также выделением продуктов обмена веществ трематод (Гинецинская, 1968). В результате воздействия паразитов у хозяина наблюдаются сдвиги в углеводном и жировом обмене, нарушения белкового метаболизма (Стадниченко, 1970; Стадниченко, 1978). Кроме того, успешное образование метацеркарий возможно только при подавлении или избегании иммунных реакций хозяина (Юрлова и др., 2000). В процессе сосуществования моллюска и трематод хозяева могут вырабатывать механизмы внутренней защиты и устойчивости, при этом, вероятно, определенная роль принадлежит детоксицирующим ферментам, в том числе неспецифическим эстеразам.

Изучение активности эстераз в тканях моллюсков *L. stagnalis* и *L. tumida* при одиночном и смешанном заражении церкариями трематод *E. aconiatum* и *M. anceps* ранее не проводилось. Известно, что помимо видовых различий в активности неспецифических эстераз у беспозвоночных животных активность фермента может изменяться в зависимости от стадии развития, возраста и пола (Рославцева и др., 1993; Jordaens et al., 1999). Наши исследования показали, что среди моллюсков от 2 до 8 мм наибольшая активность неспецифических эстераз регистрируется у особей с высотой раковины 3—4 мм. Мы предположили, что на уровень эстеразной активности в тканях хозяина может влиять инвазия моллюсков метацеркариями трематод, и оценили активность неспецифических эстераз после заражения церкариями паразита. Оказалось, что через 2 сут после инвазии регистрируется увеличение ферментативной активности у зараженных особей в зависимости от размера моллюсков и вида трематод. У животных с высотой раковины от 5 до 8 мм активность эстераз достоверно возрастала как при одиночном, так и при смешанном заражении по сравнению с интактными особями. В процессе эволюции паразито-хозяинных отношений сформировались механизмы, позволяющие сосуществовать паразиту и хозяину. Высокий уровень активности детоксицирующих ферментов в данном случае необходим хозяину для уничтожения токсических молекул, которые могут вырабатываться в тканях при внедрении церкарии в организм моллюска. Соответственно паразит может закончить свое развитие, не вызывая гибель хозяина. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, которые регистрировали увеличение активности эстераз у моллюска *L. truncatula* после заражения трематодой *F. hepatica* (Humiczewska, Rajski, 2005). Кроме того, известно, что инвазия моллюсков личинками трематод вызывает изменения активности не только эстераз, но и других гидролаз — кислой и щелочной фосфатаз, уровень которых также повышается у зараженных животных, свидетельствуя тем самым о нарушении углеводного обмена у хозяина (Dennis et al., 1974; Стадниченко, 1978). Необходимо отметить, что упомянутые авторы проводили исследования при заражении моллюсков партенитами трематод, локализованными в гепатопанкреасе моллюсков, тогда как наши результаты получены при инвазии метацеркариями трематод, местом поселения которых служит легочная полость моллюсков. Таким образом, повышение активности ферментов может являться ответом и первого, и второго промежуточных хозяев на заражение трематодами.

Изучение эстеразной активности в динамике в зависимости от продолжительности существования паразито-хозяинной системы показало снижение активности неспецифических эстераз в тканях зараженных моллюсков *L. stagnalis* (3—4 мм) и *L. tumida* (4 мм) через 26 сут после инвазии трематодой *E. aconiatum*. Возможно, это обусловлено видовыми особенностями паразита, поскольку при смешанном заражении (*E. aconiatum* + *M. anceps*) в тканях *L. stagnalis* зарегистрировали достоверное повышение активности эстераз по сравнению с контролем, а при инвазии *M. anceps* не наблюдали различий в ферментативной активности между зараженными и интактными моллюсками (рис. 4). Не исключено, что уменьшение активности неспецифических эстераз является результатом снижения общего метаболизма на данном этапе взаимоотношений хозяина и паразита, представленного метацеркарией.

Проведенные эксперименты позволили выявить видовые различия в приживаемости метацеркарий 2 видов в организме моллюсков. При этом через 2 сут после заражения относительный уровень приживаемости *E. aconiatum* был выше, чем *M. anceps*. Наблюдения за природной популяцией *L. stagnalis* показывают, что интенсивность заражения моллюсков трематодой *E. aconiatum* выше, чем *M. anceps* (Yurlova et al., 2006). Кроме того, зарегистрирована смертность зараженных особей хозяина через 26 сут после инвазии, причем она отмечалась только среди моллюсков с высотой раковины 2 мм. Полученные результаты позволяют предполагать, что моллюски малого размера «не позволяют» паразиту полноценно завершить свое развитие. Увеличение смертности моллюсков малых размеров после заражения церкариями трематод зарегистрировано также в паразито-хозяинной системе *Biomphalaria glabrata — Echinostoma caproni* (Schneck, Fried, 2004). Следует отметить, что наблюдения за природной популяцией *L. stagnalis* показали, что особи малых размеров, от 2 до 5 мм, как правило, не заражены метацеркариями трематод изучаемых видов (неопубликованные данные). Возможно, это связано с высокой активностью эстераз моллюска, но также не исключено, что размеры паразита, сопоставимые с размерами хозяина, делают невозможным заражение молоди моллюсков церкариями трематод в природе.

Тенденция к увеличению уровня активности неспецифических эстераз у зараженных моллюсков позволяет предположить, что в случае заражения анализируемый образец гомогената моллюска «содержит» не только эстеразы хозяина, но и паразита. Так, предварительные результаты изучения спектров эстераз гомогенатов тканей моллюска *Codiella trosheli* из природной популяции, зараженной метацеркариями трематоды *Cyclocoelum* sp., и гомогенатов этих метацеркарий показывают присутствие нескольких изоформ неспецифических эстераз у паразита (неопубликованные данные), что может подтверждать наше предположение. Однако сопоставление данных настоящего исследования по удельной активности фермента в гомогенатах тканей и относительной приживаемости церкарий *E. aconiatum* и *M. anceps* в моллюсках позволяет полагать, что увеличение эстеразной активности при заражении трематодами связано с ответом хозяина на присутствие паразита в организме. Аналогичные результаты, показывающие, что на повышение активности неспецифических эстераз могут оказывать влияние различные инвазии, были получены при изучении насекомых. В частности, установлено, что энтомопатогенные грибы и микроспоридии вызывают появление индуцибельных эстераз и повышение общей эстеразной активности в тканях чешуекрылых (Серебров и др., 2001; Yefimenko et al., 2001; Воронцова и др., 2006). У представителей прямокрылых обнаружено усиление активности карбоксилэстераз при заражении кокцидиями (Соколова, Сундуков, 1999).

Таким образом, показано, что одиночная и смешанная инвазии моллюсков церкариями трематод *E. aconiatum* и *M. anceps* приводит к изменению активности неспецифических эстераз в тканях зараженных животных. На изменение эстеразной активности влияет размер хозяина и вид паразита.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 07-04-01416-а), Министерства науки Российской Федерации (грант НШ-1038.2006.4), Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 19.

Список литературы

Атаев Г. Л., Полевщиков А. В. Защитные реакции брюхоногих моллюсков. 1. Клеточные реакции // Паразитология. 2004. Т. 38, вып. 4. С. 342—351.

Атаев Г. Л., Еремина Е. Е., Полевщиков А. В. Защитные реакции брюхоногих моллюсков. Гуморальные реакции // Паразитология. 2005. Т. 39, вып. 1. С. 3—15.

Воронцова Я. Л., Ершов Н. И., Глупов В. В. Влияние микроспоридии Vairimorpha ephestiae (Microsporidia: Burenellidae) на активность и спектр неспецифических эстераз различных тканей личинок большой пчелиной огневки Galleria mellonella (Lepidoptera: Pyralidae) // Паразитология. 2006. Т. 40, вып. 1. С. 74—84.

Гинецинская Т. А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. Л.: Наука, 1968. 411 с.

Плохинский Н. А. Биометрия. М.: Изд-во МГУ, 1970. 367 с.

Рославцева С. А., Баканова Е. И., Еремин О. Ю. Эстеразы членистоногих и их роль в механизмах детоксикации инсектоакарицидов // Изв. РАН. Сер. биол. 1993. № 3. С. 368—375.

Серебров В. В., Алексеев А. А., Глупов В. В. Изменение активности и спектра эстераз гемолимфы гусениц вощинной моли Galleria mellonella L. (Lepidoptera: Pyralidae) при микозах // Изв. АН. Сер. биол. 2001. № 5. С. 588—592.

Соколова Ю. Я., Сундуков О. В. Подавление активности эстераз как особенность патогенеза микроспоридиоза сверчков Gryllus bimaculatus // Паразитология. 1999. Т. 33, вып. 6. С. 527—536.

Стадниченко А. П. Изменение белкового спектра крови Viviparus contectus (Millet, 1813) (Gastropoda, Prosobranchia) при инвазии личиночными формами трематод // Паразитология. 1970. Т. 4, вып. 5. С. 484—488.

Стадниченко А. П. Изменение некоторых показателей углеводного обмена в гемолимфе пресноводных моллюсков при инвазии их партенитами и личинками трематод // Паразитология. 1978. Т. 12, вып. 6. С. 472—478.

Юрлова Н. И., Водяницкая С. Н., Глупов В. В. Анализ взаимоотношений в системе паразит—хозяин (на примере моллюсков и трематод) // Успехи современной биологии. 2000. Т. 120, № 6. С. 573—580.

Юрлова Н. И. Влияние паразитирования трематод на репродуктивный потенциал природной популяции Lymnaea stagnalis (Gastropoda, Lymnaeidae) // Зоол. журн. 2003. Т. 82, № 9. С. 1027—1037.

Юрлова Н. И., Сербина Е. А. Новые сведения о Cyathocotyle bushiensis Khan, 1962 (Trematoda: Cyathocotylidae) // Паразитология. 2004. Т. 38, вып. 2. С. 191—205.

Яковлева Н. В., Самойлович М. П., Горбушин А. М. Поливариантность стратегий защиты от патогенов у моллюсков // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2001. Т. 37, № 4. С. 270—277.

Asperen K. van. A study of housefly esterase by means of a sensitive colorimetric method // Journ. Insect Physiol. 1962. Vol. 8. P. 401—416.

Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248—254.

Coeurdassier M., Gomot-De Vaufleury A., Saint-Denis M., Ribera D., Narbonne J. F., Badot P. M. Effects of dimethoate on snail B-esterase and growth as a function of dose, time and exposure route in a laboratory bioassay // Biomarkers. 2002. Vol. 7. P. 138—150.
Dennis E. A., Sharp M., Douglass R. Carbohydrate reserves and phosphatase activity in the mollusc-trematode relationship of Mytilus edulis L. and Proctoeces maculatus (Looss, 1901) Odhner, 1911 // Journ. Helminthol. 1974. Vol. 48. P. 1—14.
de Jong-Brink M., Hoek R. M., Lageweg W., Smit A. B. Schistosome parasites induce physiological changes in their hosts by interfering with two regulatory systems, the internal defence system and the neuroendocrine system // Parasites and Pathogens. Effects of host Hormones and Behaviour. New York, 1997. P. 57—.
Galloway T. S., Millward N., Browne M. A., Depledge M.H. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc Mytilus edulis using combined esterase activities as biomarkers // Aquat. Toxicol. 2002. Vol. 61. P. 169—180.
Granath W. O Jr., Yoshino T. P. Lysosomal enzyme activities in susceptible and refractory strains of Biomphalaria glabrata during the course of infection with Schistosoma mansoni // Journ. Parasitol. 1983. Vol. 68. P. 1018—1026.
Grew A. E., Esh G. W. Histopathology of larval trematode infections in freshwater pulmonate snail, Helisoma anceps // Journ. Invertebr. Pathol. 1987. Vol. 49. P. 76—82.
Humiczewska M., Rajski K. Some enzymes associated with lipid catabolism in the Fasciola hepatica larvae—Galba truncatula system. I. Esterases and lipases // Wiad. Parazytol. 2005. Vol. 51. P. 233—238.
Hurd H. Physiological and behavioral interactions between parasites and invertebrate hosts // Adv. Parasitol. 1990. Vol. 29. P. 271—318.
Jordaens K., Van Riel P., Verhagen R., Backeljau T. Food-induced esterase electromorphs in Carinarion spP. and their effects on taxonomic data analysis (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae) // Electrophoresis. 1999. Vol. 20. P. 473—479.
Lee C. G., Kim S. K., Lee C. Y. Rapid growth of Lymnaea virides, the intermediate host of Fasciola hepatica, under laboratory conditions // Veterinary Parasitol. 1994. Vol. 51. P. 327—331.
Liska D. J. The detoxification enzyme system // Altern. Med. Rev. 1998. Vol. 3. P. 187—198.
Mikhailov A. T., Torrado M., Korochkin L. I., Kopantzeva M. A., Mendez J. Male-predominant carboxylesterase expression in the reproductive system of molluscs and insects: immunochemical and biochemical similarity between Mytilus male associated polypeptide (MAP) and Drosophila sex-specific esterase S. // ComP. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 1997. Vol. 118. P. 197—208.
Schneck J. L., Fried B. Effects of snail size on encystment of Echinostoma caproni in juvenile Biomphalaria glabrata (NMRI strain) and observations on the survival of infected snails // Journ. Helminthol. 2004. Vol. 78. P. 277—279.
Sogorb M. A., Vilanova E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis // Toxicol. Lett. 2002. Vol. 128. P. 215—228.
Vioque-Fernandez A., de Almeida E. A., Ballesteros J., Garcia-Barrera T., Gomez-Ariza J. L., Lopez-Barea J. Donana National park survey using crayfish (Procambarus clarkii) as bioindicator: Esterase inhibition and pollutant levels // Toxicol. Lett. 2007. Vol. 168. P. 260—268.
Wang H., Cai W. M., Wang W. X., Yang J. M. Molluscicidal activity of Nerium indicum Mill, Pterocarya stenoptera DC, and Rumex japonicum houtt on Oncomelania hupensis // 2006. Vol. 19. P. 245—248.
Yefimenko T. M., Sundukov O. V., Issi I. V. Effect of microsporida infection on the esterases activities in Agrotis segetum caterpillars // Vestnik zoologii. 2001. Vol. 35. P. 45—50.
Yurlova N. I., Vodyanitskaya S. N., Serbina E. A., Biserkov V. Y., Georgiev B. B., Chipev N. H. Temporal variation in prevalence and abundance of metacercariae in the pulmonate snail Lymnaea stagnalis in Chany Lake, West Siberia, Russia: Long-term patterns and environmental covariates // Journ. Parasitol. 2006. Vol. 92, N 2. P. 242—248.

AN ACTIVITY OF NONSPECIFIC ESTERASES IN HOMOGENATES OF LYMNAEA STAGNALIS AND LYMNAEA TUMIDA SNAILS (GASTROPODA: PULMONATA) INFECTED BY TREMATODE CERCARIAE ECHINOPARYPHIUM ACONIATUM AND MOLINIELLA ANCEPS (ECHINOSTOMATIDAE)

Ya. L. Vorontsova, N. I. Yurlova, S. N. Vodyanitskaya, V. V. Glupov

Key words: esterase, snail, *Lymnaea*, Trematoda, cercaria, *Echinoparyphium aconiatum*, *Moliniella anceps.*

SUMMARY

The comparative analysis of esterase changes in homogenates of the snails *Lymnaea stagnalis* and *L. tumida* bodies was carried out. Juvenile snails with shell size 2 mm, 3—4 mm, 5—6 mm and 7—8 mm were exposed to cercariae of the trematodes *Echinoparyphium aconiatum* and/or *Moliniella anceps.* The esterase activity was detected spectrofotometrically. The highest level of esterase activity in noninfected *L. stagnalis* was registered in snails with shell size 3—4 mm. The invasion of snails by trematode cercariae results in a change of esterase activity in the tissues of infected snails. The activity of easterases was increased in the infected *L. stagnalis* snails with shell size 5—8 mm at 2 days post invasion in comparison with control. The decrease of esterase activity in tissues of infected snails *L. stagnalis* (3—4 mm) and *L. tumida* (4 mm) was observed at 26 days post invasion by *E. aconiatum* only. The host size and parasite species was influenced on esterase activity in the snails.