

УДК 595.122 : 59.084:591.044

## МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ХЕМОРЕАКЦИЙ ЦЕРКАРИЙ ТРЕМАТОД

© 2019 г. В. В. Прокофьев\*

Псковский государственный университет,  
пл. Ленина, д. 2, Псков  
180000, Россия  
\*e-mail: prok58@mail.ru

Поступила в редакцию 10.03.2019 г.  
После доработки 31.05.2019 г.  
Принята к публикации 07.06.2019 г.

Экспериментально подбирали наиболее подходящие методики для исследования хемореакций церкарий трематод. Для изучения контактных реакций наиболее эффективным оказалось использование агаровых блоков, пропитанных метаболитами вторых промежуточных хозяев, а для дистантных рекаций – использование микроаквариумов с узкими каналами, в которых создается градиент сигнала.

**Ключевые слова:** трематоды, церкарии, хемореакции, методы.

**DOI:** 10.1134/S0031184719040057

В сложном жизненном цикле трематод (Trematoda, Digenea) личинка (церкария) половозрелых особей гермафродитного поколения (марит) выполняет расселительную функцию. В ее задачи входят поиск и проникновение в организм второго промежуточного или дефинитивного хозяев. При этом церкария ориентируется в пространстве при помощи системы таксисов и кинезов (см. обзоры: Naas, 2003; Chaisson, Hallem, 2012). Они позволяют личинке найти «пространство хозяина» и/или пребывать в этом пространстве, т.е. там где встреча с потенциальным животным-хозяином наиболее вероятна, а при появлении хозяина в непосредственной близости – обнаружить и напасть на него (Combes, 2001).

Одним из наименее изученных аспектов биологии церкарий является вопрос о наличии и особенностях проявления у них хемореакций. Такое положение во многом объясняется методическими сложностями проведения подобных исследований, в частности, трудностью выбора критериев наличия или отсутствия у этих личинок хемочувствительности в условиях эксперимента. Немногие исследования, которые посвящены анализу этого явления, выполнены на «пресноводных» трематодах, жизнедеятельность личинок которых походит в пресноводных бассейнах (Fried, King 1989; Naas et al., 1995, 2002; Körner, Naas 1998a, 1998b и др.). Установлено, что следует различать дистант-

ную и контактную хемочувствительность. Дистантная, благодаря которой церкария ищет хозяина, выявлена у личинок некоторых эхиностоматид (*Pseudechinoparyphium echinatum*, *Echinostoma revolutum*) (Haas, 2003), которые для своего дальнейшего развития должны заразить моллюска. Ориентация идет по выделяемым моллюсками метаболитам (компоненты слизи, аминокислоты, моча, аммиак и др.), градиент которых, после выделения, в условиях спокойного пресного водоема какое-то время сохраняется в толще воды (Haas et al., 1995; Körner, Haas, 1998a, 1998b, Haberl et al., 2000).

Контактными реакциями обладают, по-видимому, многие, если не все церкарии. С помощью этих реакций идет распознавание подходящего хозяина при контакте с ним или выбраковка неподходящего, поиск места внедрения и сам процесс внедрения. До настоящего времени хемочувствительность при контакте с хозяином изучена только для ряда видов Schistosomatidae и Diplostomidae (Haas, 2003). Распознавание ведется по целому комплексу макромолекул, ассоциированных с покровами хозяина. Это жирные кислоты, керамиды, хлистерол, L-аргинин и др. для церкарий шистосоматид, заражающих млекопитающих и птиц; и углеводы, гликопротеины, жирные кислоты и др. для диплостомид, инвазирующих рыб (Haas, 2003).

Работы же по хемочувствительности морских видов трематод, включая те, которые реализуют свои жизненные циклы в экосистемах литорали и верхней сублиторали, отсутствуют, что и побудило нас приступить к их исследованию. На первом этапе необходимо было разработать адекватные методики проведения экспериментов с церкариями морских трематод. Их описанию и посвящена статья. В качестве модельных объектов были выбраны церкарии *Himasthla elongata* (Mehlis, 1831) (Himasthliidae, Echinostomatoidea) и *Cryptocotyle lingua* (Creplin, 1825) Fiscoeder, 1903 (Heterophyidae). В условиях Белого моря, где проводилось исследование, вторым промежуточным хозяином, которого заражают церкарии, для *H. elongata* являются двустворки *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 (Mytilidae), а для *C. lingua* – молодь разных видов прибрежных рыб.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа выполнена на Беломорской биологической станции ЗИН РАН («Картеш»), расположенной в губе Чупа Белого моря, в июле-августе 2017–2018 гг. Источником церкарий для экспериментов служили литоральные моллюски *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758), зараженные партенидами трематод *H. elongata* и *C. lingua*. Моллюсков собирали вблизи биостанции, индивидуально помещали в пластиковые емкости объемом 70 мл и выставляли на 0.5–1 ч на солнце или под свет лампы накаливания (20 000–30 000 лк).

После этого емкости просматривали с помощью стереомикроскопа МСП-1 и отбирали литорин, выделивших церкарий. Этих моллюсков содержали в садке в естественных условиях (в бухте Кривозерская у причала ББС) и по мере необходимости использовали для получения церкарий, необходимых для эксперимента, по методике, описанной выше.

Контактные реакции церкарий изучали с помощью агаровых моделей. Для этого перед проведением опыта предварительно готовили 1.5% бакто-агар. После застывания агара из него вырезали бруски размером 3x3x1.5 мм. Блоки помещали на 1 сутки в сосуд с водой температурой 10–12 °С, где находились либо вторые промежуточные хозяева исследуемых церкарий (мидии или маслюки), либо слизь с покровов трески. В эту воду выделялись метаболиты хозяев, и агаровые блоки, соответственно, пропитывались этими веществами. Вода с метаболитами хозяев определялась нами как «кондиционированная». Затем блоки, выдержанные в «кондиционированной» воде, использовали для проведения экспериментов.

Для изучения контактных реакций церкарий была изготовлена специальная установка, включающая три отдельных микроаквариума глубиной 5 мм и диаметром 18 мм каждый, объединенных в одном блоке (80x30x8 мм) (Рис. 1А). Подобная конструкция ранее была предложена Хаасом с соавторами (Haas et al., 1995). Однако она включала лишь один микроаквариум. Объединение трех микроаквариумов в едином блоке позволяло, при необходимости, одновременно проводить два опыта и один контроль.

При проведении наблюдений «кондиционированный» брусок агара помещали в один из микроаквариумов с фильтрованной морской водой при температуре 18–20 °С. Туда же выпускали церкарий в количестве 10 экз. В другой микроаквариум помещали контрольный «чистый» агаровый брусок. Блок микроаквариумов располагали на столике бинокулярного микроскопа МБС-10 и производили видеосъемку в течение 5 мин. Каждое наблюдение повторяли 5 раз. Наличие хемореакции определяли по прикосновению церкарии к бруску с последующим кратковременным прикреплением к нему. Для этого отснятое наблюдение просматривали на мониторе компьютера и подсчитывали число касаний церкариями блока в течение 5 мин. Затем делили число касаний на число личинок и получали число касаний на одну церкарию. Подобные подсчеты проводили для всех 5 наблюдений и определяли среднее число касаний на одну церкарию.

Кроме агара, в качестве модели использовали полоски (10x3 мм) нитроцеллюлозной мембраны (Protran). Метод основан на связывании белков и гликопротеинов с молекулами нитроцеллюлозы на поверхности мембраны за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий. Для получения модели на участок мембраны наносили каплю «кондиционированной» воды и оставляли до высыхания. В результате белки и гликопротеины, содержащиеся в «кондиционированной» воде, прочно соединялись с поверхностью мембраны. Для блокирования чистых (не обработанных «кондиционированной» водой) участков мембраны от неспецифических связываний с посторонними веществами, мембрану помещали на 30 мин. в разбавленный раствор обезжиренного сухого молока с добавлением детергента Triton X-100. При этом белок из разбавленного раствора прикрепляется к мембране на всех участках, где не прикрепился целевой белок. Таким образом исключалось прикрепление к мембране посторонних химических веществ и достигалось получение более достоверных результатов. При проведении наблюдений выполняли те же манипуляции, что и с агаровыми брусками, но последние, при этом, заменяли обработанными полосками мембраны.

В целях разделения метаболитов «кондиционированных» вод на фракции была произведена попытка использовать диализные мембраны. Для этого в мешочек из диализной мембраны наливали «кондиционированную» воду в объеме 1 мл. Затем мешочек на сутки помещали в сосуд с дистиллированной водой объемом 1 мл при температуре 20 °С, где находились агаровые блоки. За счет разницы в осмотическом давлении метаболиты из мешочка через поры выходили в воду. Поры диализной мембраны пропускали вещества молекулярной массой не более 20 кДа. Соответственно, блоки впитывали лишь метаболиты, прошедшие через мембрану. Затем блоки переносили в микроаквариумы и исследовали хемореакции церкарий.

Для изучения дистантных хемореакций церкарий использовали модифицированную установку, предложенную Хаасом с соавторами (Haas et al., 1995). Она включала два блока по три микроаквариума в каждом (Рис. 1В, 1С). Каждый блок имел размеры 80x30x8 мм. Диаметр каждого микроаквариума, расположенного в центре блока, составлял 15 мм, диаметр каждого бокового микроаквариума – 5 мм.

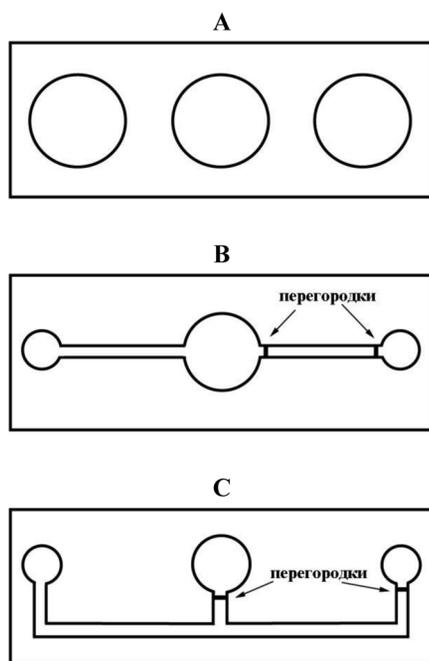
Аквариумы соединялись между собой посредством прямых (Рис. 1В) либо изогнутых (Рис. 1С) каналов. Глубина микроаквариумов и каналов составляла 5 мм. Модифицированная установка отличалась от установки Хааса с соавторами (Haas et al., 1995) не только размерами, но и тем, что мы вместо внутреннего, вращающегося цилиндра с прорезью в каждом микроаквариуме, поворотом которого достигались открытия-закрытия связи микроаквариума с каналом, применяли тонкие пластиковые либо бумажные перегородки (Рис. 1В, 1С). Использование

перегородок, в отличие от цилиндров, практически исключало микровихрения воды и, соответственно, позволяло сохранять более равномерный градиент химического сигнала.

Следует заметить, что при исследовании дистантных хемореакций микроскопических животных, к каковым относятся церкарии, серьезной проблемой является создание четко выраженного градиента тестируемого химического вещества. Особенно актуально это для малых объемов воды, когда даже незначительное сотрясение или изменение температуры приводит к движению воды и «смазыванию» градиента. Наличие узких каналов в предложенных микроаквариумах позволяет существенно снизить эффект перемешивания воды и сохранить более четкий градиент исследуемого вещества.

Перед проведением опыта выход одного из боковых аквариумов (для удобства, как правило, правого) закрывали перегородкой из стандартной фильтровальной бумаги (размер пор 12–15 мкм). В этот аквариум помещали источник химического сигнала. Наличие перегородки, с одной стороны, не препятствовало поступлению в канал химических веществ, выделяемых источником, а с другой – не давало возможности церкариям напрямую контактировать с ним, т.е. исключало возможность контактной реакции. Второй боковой аквариум оставался открытым, в него ничего не помещали, и поэтому он служил в качестве контроля.

При проведении экспериментов канал центрального аквариума (Рис. 1В, 1С) перекрывали пластиковой перегородкой, установку заполняли фильтрованной морской водой с температурой 18–20 °С. В правый микроаквариум помещали источник химического сигнала (несколько капель «кондиционированной» воды, крови или лимфы либо кусочек ткани второго промежуточного хозяина) и выдерживали в течение 5 мин. За это время в правом канале создавался градиент сигнала. Затем в центральный микроаквариум выпускали 10 экз. исследуемых церкарий, аккуратно удаляли пластиковую перегородку, соединяющую его с каналом, и через 10 мин.



**Рисунок 1.** Микроаквариумы для исследования контактных (А) и дистантных (В, С) хемореакций церкарий (пояснения в тексте).

подсчитывали число личинок в правом и левом каналах. Опыты повторяли 5 раз для всех исследуемых церкарий.

При статистической обработке результатов экспериментов достоверность различий оценивали при помощи медианного теста (m-test) для исходных данных и при помощи однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA) для данных, трансформированных методом Бокса-Кокса (Box-Cox transformed data).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведенных наблюдений и последующей их статистической обработки показали, что исследованные церкарии в той или иной степени реагируют на метаболиты заражаемых животных. При этом контактные реакции отчетливо проявлялись лишь при использовании «кондиционированных» агаровых блоков. Церкарии *H. elongata* достоверно (m-test,  $P < 0.01$ ) реагировали на метаболиты мидии. Личинки *C. lingua* демонстрировали выраженную реакцию только при контакте с метаболитами трески (ANOVA,  $P < 0.05$ ), в то время как на метаболиты колюшки и маслюка достоверной реакции обнаружить не удалось (ANOVA,  $P = 0.06$ ).

Кроме контактной реакции личинки *H. elongata* демонстрировали и отчетливую дистантную хемореакцию на метаболиты мидии (ANOVA,  $P < 0.01$ ). Подобная реакция у церкарий *C. lingua* выражена на слизь трески, маслюка (ANOVA,  $P < 0.01$ ), но не на слизь колюшки (ANOVA,  $P = 0.36$ ).

Выявить заметную реакцию исследуемых церкарий на мембранные модели не удалось. По-видимому, это связано с очень низкой концентрацией метаболитов исследуемых животных на поверхности мембран. Использование «кондиционированной» воды, пропущенной через диализные фильтры, также не дало результатов. Возможно личинки реагируют на вещества с молекулярной массой более 20 кДа либо концентрация веществ, проходящих через поры фильтра, слишком мала, чтобы исследуемые церкарии смогли их распознать. Последнее представляется более вероятным, поскольку изученные к настоящему времени хемочувствительные церкарии при поиске хозяина реагируют на низкомолекулярные соединения (Haas, 2003). Так, церкарии *Diplostomum spathaceum* (Rudolphi, 1819) демонстрировали продолжительный контакт с агарозой, пропитанной гидрофильными экстрактами кожи рыбы массой менее 3 кДа (Haas et al., 2002).

Полученные результаты позволяют заключить, что наиболее подходящими из числа описанных методами исследования хемочувствительности церкарий морских трематод оказались: для контактных реакций – применение агаровых моделей, пропитанных метаболитами хозяев, а для дистантных – микроаквариумов с узкими каналами, в которых создается градиент сигнала. Эти методы показали достаточно высокую эффективность и могут быть рекомендованы как основные для исследования хемореакций церкарий, что не исключает необходимость проводить поиск и отработку других методических подходов к изучению этой черты поведения личинок трематод.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках проекта РФФ № 18-14-00170.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chaisson K.E., Hallem E.A. 2012. Chemosensory behaviors of parasites. *Trends in Parasitology* **28** (10): 427–436.
- Combes C. 2001. Parasitism, the ecology and evolution of intimate interactions. The University of Chicago Press, Chicago and London, 728 p.
- Fried U., King W. 1989. Attraction of *Echinostoma revolutum* cercariae to *Biomphalaria glabrata* dialysate. *Journal of Parasitology* **75**: 55–57.
- Haas W. 2003. Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasion. *Zoology* **106**: 349–364.
- Haas W., Korner M., Hutterer E., Wegner M., Haberl B. 1995. Finding and recognition of the snails intermediate host 3 species of echinostome cercariae. *Parasitology* **110**: 133–142.
- Haas W., Stiegeler P., Keating A., Kullmann B., Rabenau H., Schonamsgruber E., Haberl B. 2002. *Diplostomum spathaceum* cercariae respond to a unique profile of cues during recognition of their fish host. *International Journal for Parasitology* **32**: 1145–1154.
- Haberl, B., Korner M., Spengler Y., Hertel J., Kalbe M., Haas W. 2000. Host-finding in *Echinostoma caproni*: miracidia and cercariae use different signals to identify the same snail species. *Parasitology* **120**: 479–486.
- Korner M., Haas W. 1998a. Chemo-orientation of echinostome cercariae towards their snail hosts: amino acids signal a low host-specificity. *International Journal for Parasitology* **28**: 511–516.
- Korner M., Haas W. 1998b. Chemo-orientation of echinostome cercariae towards their snail hosts: the stimulating structure of amino acids and other attractants. *International Journal for Parasitology* **28**: 517–525.

#### METHODS EFFECTIVE IN THE STUDY OF CHEMO-ORIENTATION BEHAVIOR IN TREMATODE CERCARIAE

V. V. Prokofiev

**Keywords:** trematodes, cercariae, chemo-orientation, methods

#### SUMMARY

The most appropriate methods for experimental study of cercarial response to host chemical signals were tested. The use of agar blocks impregnated with the second intermediate host metabolites was found to be the most effective for the study of contact responses, and the use of experimental chambers with narrow channels with gradient of chemicals, for the study of distant responses.