

УДК 576.89:591.481.42

ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ВЫЯВЛЕНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ GABA В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ГЕЛЬМИНТОВ – ПАРАЗИТОВ РЫБ

Н.М. Бисерова, М.М. Сальникова, И.И. Гордеев

Аннотация

С целью разработки новых принципов действия антигельминтных препаратов против цестодозов и асантацефалозов были исследованы паразиты морских и пресноводных рыб на предмет наличия и распределения гамма-аминомасляной кислоты (GABA – γ -aminobutyric acid) – тормозного медиатора нервной системы животных и человека.

Положительная иммунореакция на GABA была выявлена в центральной нервной системе (ЦНС) всех изученных червей. Интенсивность и распределение GABA-иммунореакции различались у разных видов гельминтов, а также в разных отделах центральной и периферической нервной системах. В ганглии скребня *Echinorynchus gadi* все нейроны обладали высокой GABA-положительной иммунореакцией, тогда как в церебральных ганглиях цестод были обнаружены отдельные пары симметрично расположенных нейронов.

Электронномикроскопические исследования выявили иммунореакция на GABA в синаптических окончаниях на поверхности крупных продольных мышц *Triaenophorus nodulosus*. Метка (10 нм) группировалась как на складочках пресинаптической мембраны, так и внутри овальных прозрачных везикул диаметром 20 нм. Кроме того, метка была обнаружена в межклеточном пространстве и на поверхности сарколеммы в зоне синаптического контакта. Это указывает на наличие GABA-рецепторов на поверхности мышечных клеток. Кроме нейромышечных синапсов, GABA была выявлена в светлых везикулах мелких аксонов, цистернах эндоплазматического ретикулума и светлых везикулах крупных аксонов в составе ГЛС. В нейронах ганглия *E. gadi* метка (5 нм) была выявлена в цитоплазме и на мембранах митохондрий.

Хотя ранее было указано на отсутствие GABA в нервной системе ленточных червей, в результате проведенного нами исследования гамма-аминомасляная кислота впервые выявлена у 3 видов цестод, представителей отрядов Pseudophyllidea и Caryophyllidea и представителя акантацефаллид – *Echinorynchus gadi*.

Введение

Гамма-аминомасляная кислота (GABA – γ -aminobutyric acid) является блокирующим или тормозным медиатором многих животных, в том числе круглых гельминтов, таких как нематоды. Известно, что GABA-рецепторы имеются на мембранах мышечных клеток аскарид, блокирование этих рецепторов приводит к параличу [1]. У цестод и скребней наличие и распределение этого медиатора не исследовано.

С целью выявления нейроактивных субстанций, участвующих в иннервации прикрепительного аппарата и мускулатуры тела, было проведено подроб-

ное изучение ряда плоских и круглых гельминтов – опасных паразитов морских и пресноводных промысловых рыб.

1. Материал и методы

Методами флуоресцентной, конфокальной лазерной и трансмиссионной электронной микроскопии были изучены плоские и круглые гельминты: *Triephorus nodulosus* (Cestoda: Pseudophyllidea) из кишечника щуки и печени окуня, *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea) из полости тела леща и синца, *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda: Caryophyllidea) из кишечника леща, *Echinorhynchus gadi* (Acanthocephala) из кишечника беломорской трески.

Изучение распределения нейроактивных субстанций (в частности, GABA) проводили на светооптическом уровне, применяя метод двойного иммуноцитохимического окрашивания нервной системы гельминтов с использованием дополнительных моноклональных антител к серотонину (5-HT) и нейропептидам (GYIRF-amide, FMRF-amide) и вторичных антител, конъюгированных с флуорохромами.

Для выявления GABA-эргических элементов на ультраструктурном уровне использовали моноклональные первичные антитела анти-GABA (Chemicon) в разведении 1 : 50 и вторичные антитела, конъюгированные с коллоидным золотом 5 или 10 нм.

2. Результаты

2.1. Выявление GABA в нервной системе скребней. Церебральный ганглий *Echinorhynchus gadi* (Acanthocephala) размещен в полости влагалища хоботка и оказывается прижатым к боковой стенке специальными мышцами – ретракторами хоботка. Положительная иммунореакция была выявлена во всех типах нейронов (рис. 1, в). При окрашивании метка обнаружена в цитоплазме нейроцитов и их отростках, тогда как ядра нейронов свободны от метки. Фоновое окрашивание было близко к нулю. Наибольшая интенсивность метки отмечена для темных нейронов промежуточной и некоторых нейронов центральной зоны, для которых характерно присутствие большого количества митохондрий. Обращает внимание присутствие специфической метки и на мембранах митохондрий. На наш взгляд, это связано с анаэробным механизмом дыхания эндопаразитов и метаболизмом аминокислот. Синтез GABA – анаэробный процесс, происходящий в цитоплазме, в то время как деградация GABA требует присутствия кислорода. Этот процесс должен происходить в митохондриях.

2.2. Выявление GABA в нервной системе цестод. Тело *Caryophyllaeus laticeps* (Caryophyllidea) лишено внешней и внутренней сегментации, передний конец расширен в виде складчатой розетки, обладает волнообразной подвижностью и слабо прикрепляется к слизистой кишечника хозяина путем плотного прилегания и приклеивания с помощью секрета многочисленных желез.

Положительная иммунореакция на гамма-аминомасляную кислоту была выявлена в ЦНС, главных латеральных нервных стволах (ГЛС), проходящих вдоль всего тела цестоды, а также в их разветвлениях в розетке сколекса; кроме

того, в периферической части нервной системы – волокнах, связанных с кольцевыми мышцами тела, и в субтегументальной области сколекса. Тела GABA-иммунореактивных нейронов обнаружены как в ЦНС (в главных стволах), так и в периферических отделах, вблизи продольного слоя мускулатуры (рис. 1, а, б). В отростках GABA-эргических нейронов наблюдается более интенсивная реакция, чем в их перикарионах, что свидетельствует о большей концентрации медиатора в зоне формирования синаптических контактов. В ГЛС отростки часто проходят поперек ствола или зигзагообразно, что, вероятно, связано с внедрением мышечных пучков в нервный ствол. Вдоль мышечных волокон выявлены содержащие GABA терминалы, которые образуют множественные варикозы вокруг отростков серотонинергических нейронов. В сколексе обнаружены многочисленные иммунофлуоресцентные GABA-эргические волокна, образующие субтегументальную мелкоячеистую сеть и сгущения в складках сколекса.

В паразите леща – *Ligula intestinalis* (Pseudophyllidea) – компартменты нервной системы, иммунореактивные к GABA, выявлены в главных латеральных стволах в виде интенсивно окрашенных и компактно расположенных тяжей. Тела GABA-эргических нейронов расположены как в ГЛС, так и на периферии, в области субтегументальной мускулатуры. При двойном окрашивании препаратов колокализации GABA с серотонином или нейропептидами группы RF не обнаружено.

При исследовании гистологических срезов паразита щуки *Triaenophorus nodulosus* (Pseudophyllidea) GABA-иммунореактивные клетки обнаружены в сколексе и шейке. Тела клеток лежат парами в поперечной комиссуре сколекса и в шейке. Очень тонкие отростки высвечиваются между мышечными волокнами ботрий, прикрепительных органов сколекса, и между крупными продольными мышцами шейки.

Электронномикроскопические исследования крупных продольных мышц *T. nodulosus* выявили на их поверхности синаптические окончания, которые содержали светлые овальные везикулы диаметром 20–30 нм. Применяв метод иммуноцитохимического мечения GABA с иммунным золотом (10 нм) в качестве вторичных антител, было показано, что такие синаптические окончания включают метку как на поверхности пресинаптической мембраны, так и внутри овальных прозрачных везикул. Чаще всего метка группировалась на складочках пресинаптической мембраны, отличающих нейромышечные синапсы *T. nodulosus*. Кроме того, метка была обнаружена в межклеточном пространстве и на поверхности сарколеммы в зоне синаптического контакта. Это указывает на наличие GABA-рецепторов на поверхности мышечных клеток.

Кроме нейромышечных синапсов, GABA была выявлена в светлых везикулах мелких аксонов, цистернах эндоплазматического ретикулума и светлых везикулах крупных аксонов в составе ГЛС. Крупные аксоны содержали метку при выходе из ГЛС и затем в области контакта с продольным мышечным волокном. На поверхности крупных продольных мышц тормозные GABA-синапсы образованы выходящими из ГЛС нервными волокнами и являются периферическими. Кроме того, GABA-эргические нейромышечные контакты обнаружены в центральной части нервной системы, в главных стволах, где они сформированы входящими из субтегументальной области мышечными отростками и центральными аксонами.

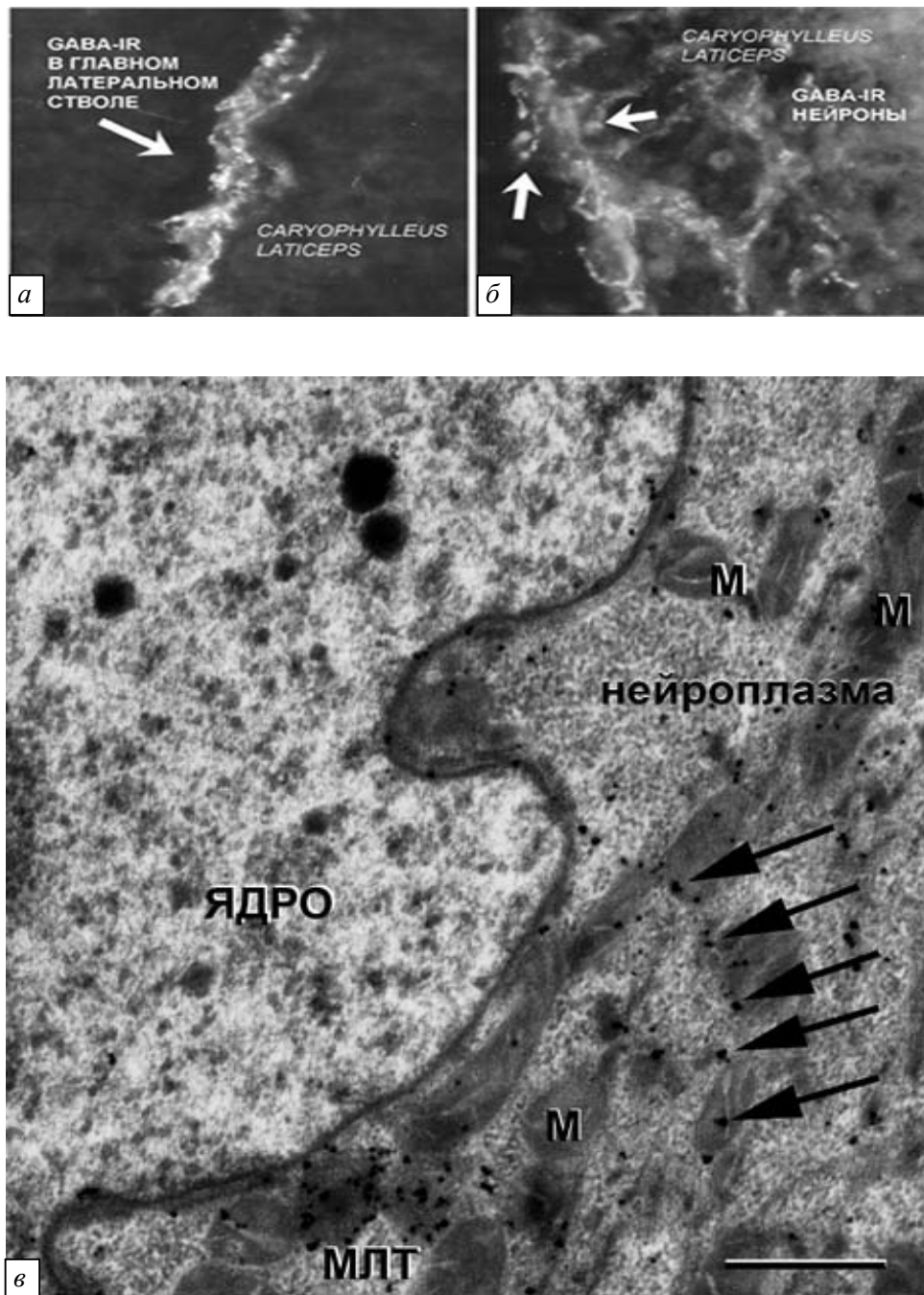


Рис. 1. Выявление гамма-аминомасляной кислоты (GABA) в нервной системе цестод и скребней: *a* – GABA-эргические нейроны в главном латеральном стволе *Caryophylleus laticeps*; *б* – GABA-эргические нейроны в периферической нервной системе *Caryophylleus laticeps*; *в* – GABA-положительная иммунореакция (указана стрелками) в нейронах скребней *Echinorynchus gadi*

3. Выводы

В результате проведенного исследования гамма-аминомасляная кислота впервые выявлена у 3 видов цестод, представителей отрядов Pseudophyllidea и Caryophyllidea и представителя акантоцефаллид – *Echinorynchus gadi*.

Установлено активное участие медиатора ГАВА в иннервации сколекса и кольцевой мускулатуры тела кариофиллид, крупной продольной мускулатуры тела псевдофиллид. В нервной системе изученных гельминтов присутствует одновременная иннервация эффекторов системами различной эргичности. В то же время одновременная локализация нейроактивных субстанций внутри нейронов или их отростков нами не обнаружена. Полученные данные косвенно подтверждают блокирующую функцию ГАВА в ЦНС-цестод.

Ультраструктурными методами показано присутствие ГАВА в цитоплазме ганглионарных нейронов скребней и в составе везикул нейромышечных синапсов цестод.

Выявление гамма-аминомасляной кислоты в нервной системе плоских гельминтов и скребней и ее участие в иннервации крупных мышечных волокон тела и прикрепительного аппарата свидетельствуют о возможности создания на ее основе новых антигельминтных препаратов и расширения спектра использования уже известных лекарств.

Исследования поддержаны ФЦП (проект № 2007-2-1.2-04-03) и РФФИ (проект № 06-04-48667).

Summary

N.M. Biserova, M.M. Salnicova, I.I. Gord. Immunocytochemical evidence and localization of GABA in the nervous systems of fish parasites.

Immunocytochemical detection and occurrence of the γ -aminobutyric acid (GABA) in the CNS of the helminthes were demonstrated for the purpose to formulate new principles of the anthelmintic activity.

Immunoreactivity towards GABA has been found in the CNS of all examined species. The localization of the GABA-immunoreactivity (GABA-IR) was different in various helminthes, and also within compartments of the nervous system.

Whereas in *Echinorynchus gadi* (Acanthocephala) the positive GABA-IR it has been revealed in all ganglionar neurons, in cestodes there are only one or two pairs of the GABAergic neurons in the cerebral ganglia.

Ultrastructural investigations of the intracellular GABA localization were undertaken for cestodes and acanthocephalans. By TEM with using anti-GABA immunogold staining clear vesicles (20-30nm) containing gold-labels (10nm) were found in synaptic ending on the surface of large longitudinal body muscles in *Triaenophorus nodulosus*. Also gold particles were located in synaptic cleft and on the sarcolemma within neuromuscular junction what evident the existing of the GABA receptors on the muscle cell membranes. In ganglionar GABAergic neurons of *Echinorynchus gadi* gold-labels (5 nm) were concentrated in cytoplasm and also on mitochondrial membranes.

Although it has been previously, stated that GABA-IR in absent in parasitic flatworms, we could, nevertheless detected GABA-IR in the CNS and PNS of three species in cestodes and in acanthocephalans with indirect immunocytochemistry. The amount and intensity of the GABA-IR nerves correlate positively with the amount and development of the musculature in the worms studied, indicating a motor function for GABA.

Литература

1. *Holden-Dye L., Walker R.J.* Avermectin and avermectin derivatives are antagonists at the γ -aminobutyric acid (GABA) receptor on the somatic muscle cells of *Ascaris*; is this the site of anthelmintic action // *Parasitology*. – 1990. – V. 101, No 2. – P. 265–271.

Поступила в редакцию
22.06.07

Бисерова Наталья Михайловна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

E-mail: nbiserova@yandex.ru

Сальникова Марина Михайловна – ассистент кафедры зоологии беспозвоночных Казанского государственного университета.

E-mail: m_salnikova@mail.ru

Гордеев Илья Иванович – студент Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.