

УДК 577.175.823;595.121

<https://doi.org/10.31016/978-5-6048555-6-0.2023.24.244-250>

**МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
СЕРТОНИНЕРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ У ЛИЧИНОК
ЦЕСТОД *MESOCESTOIDES VOGAE***

Кузнецов Г. В. ¹,
аспирант

Крещенко Н. Д. ¹,
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
nkreshch@rambler.ru

Митьковский Д. Е. ²,
студент

Теренина Н. Б. ³,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник

Хрчкова Г. ⁴,
доктор биологических наук, заведующий лабораторией

Аннотация

Иммуноцитохимическое исследование личинок цестод, тетрахиридий *Mesocestoides vogae* (Cestoda, Mesocestoididae) выявило наличие серотонин-иммунопозитивных нейронов и их волокон в центральных и периферических отделах их нервной системы. Тотальные препараты анализировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Впервые измеряли размер серотонинергических нейронов, расстояние между боковыми нервными стволами, а также нервными комиссурами в головной, средней и задней частях тела личинок. Серотонинергические нервные компоненты личинок *M. vogae* выявлены в головных нервных ганглиях, расположенных

¹ Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (142290, Россия, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3)

² Государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение Московской области «Серпуховский колледж» (142207, Россия, г. Серпухов, ул. Центральная, д. 154)

³ Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук (119071, Россия, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 33)

⁴ Институт Паразитологии (040 01, Словакия, г. Кошице, ул. Хлинкова, д. 3)

между четырьмя присосками в переднем отделе тела, а также хорошо заметными тремя парами продольных нервных стволов – боковых, спинных и брюшных, соединенных поперечными комиссурами. Расстояние между боковыми нервными стволами составляет $130,90 \pm 33,92$ мкм, расстояние между нервными комиссурами $24,66 \pm 6,02$ мкм. Размеры нейронов *M. vogae*: длина $9,84 \pm 1,97$, ширина $7,19 \pm 1,50$ мкм. В головной части цестод наблюдали наиболее крупные серотонинергические нейроны. Нейроны головной и средней области тела демонстрируют наиболее интенсивную окраску. Результаты свидетельствуют о широком распространении серотонина у плоских червей, присутствующего уже на ранних стадиях их жизненного цикла.

Ключевые слова: цестоды, личинки, серотонин, нейроны, морфометрия

MORPHOMETRIC PROPERTIES OF SEROTONERGIC NEURONS IN CESTODA *MESOCESTOIDES VOGAE* LARVAE

Kuznetsov G. V. ¹,
Postgraduate Student

Kreshchenko N. D. ¹,
Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher,
nkreshch@rambler.ru

Mitkovskii D. E. ²,
Student

Terenina N. B. ³,
Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher

Hrčková G. ⁴,
Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory

Abstract

The immunocytochemical study of cestode larvae, *Mesocostoides vogae* tetrathyridia (Cestoda, Mesocostoididae) detected serotonin-immunopositive neurons and fibers in the central and peripheral nervous system. The wholemounts were analyzed

¹ Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences (3, Institutskaya st., Pushchino, 142290, Russia)

² State Budgetary Professional Educational Institution of Moscow Region "Serpukhovskiy College" (154, Centralnaya st., Serpukhov, 142207, Russia)

³ Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Center of Parasitology (33, Leninsky pr., Moscow, 119071, Russia)

⁴ Institute of Parasitology of the Slovak Academy of Sciences (3, Hlinkova, Kosice, 040 01, Slovak Republic)

by confocal laser scanning microscopy. The size of serotonergic neurons, and the distance between the lateral nerve cords, and between the commissures were measured for the first time in the head, middle, and posterior regions of the larvae. Serotonergic nerve components of the *M. vogae* larvae were detected in the nerve ganglia in the head located between four suckers on the anterior part, as well as between clearly visible three pairs of lateral, dorsal, and ventral longitudinal nerve cords connected by transverse commissures. The distance between the lateral nerve cords was $130.90 \pm 33.92 \mu\text{m}$, and between the commissures, $24.66 \pm 6.02 \mu\text{m}$. Sizes of *M. vogae*'s neurons were as follows: length, $9.84 \pm 1.97 \mu\text{m}$, and width, $7.19 \pm 1.50 \mu\text{m}$. The largest serotonergic neurons were observed in the head region of the cestodes. The neurons in the head and middle regions of the body demonstrated the most intensive staining. The results indicate wide spreading serotonin in flatworms which is already found in the early stages of their life cycle.

Keywords: cestodes, larvae, serotonin, neurons, morphometry

Введение. Работа посвящена исследованию серотонинергических компонентов в нервной системе цестод *Mesocestoides vogae* (Platyhelminthes), развивающихся со сложным жизненным циклом. Половозрелые особи *M. vogae* являются распространенным паразитом плотоядных животных – собак, кошек, лисиц, барсуков и др. Промежуточные хозяева – панцирные клещи. Дополнительными хозяевами являются амфибии, рептилии, птицы и грызуны. Инвазионные личинки – тетратиридии обитают в грудной и брюшной полостях, диафрагме, в стенках кровеносных сосудов и кишечника, печени, лимфатических узлах дополнительных хозяев.

Серотонин является возбуждающим нейротрансмиттером у свободноживущих [1] и паразитических [5] плоских червей. Серотонин был определен спектрофлуориметрически в гомогенатах тканей личинок *M. vogae*, где его количество варьировало от 0,333 до 1,146 $\mu\text{g/g}$ сырого веса [3]. Серотонинергические нервные компоненты были выявлены у тетратиридий *M. corti* (синоним *M. vogae*) [1–3], однако измерения их морфологических параметров не проводили. В настоящей работе впервые с использованием большого числа измерений проведен морфометрический анализ серотонинергических нейронов и других компонентов нервной системы личинок *M. vogae*. Нервная система тетратиридий представляет собой хорошо организованный ортогон, состоящий из парных головных ганглиев, а также нескольких пар (3–5) продольных нервных стволов. Продольные стволы связаны кольцевыми нервными комиссурами [4]. Некоторыми исследователями боковые стволы рассматриваются как главные нервные стволы [4]. Другими – как комплекс, состоящий из нескольких пар нервных

стволов [2]. Существует возможность, что боковые нервные стволы у *M. vogae* сложно устроены, имеют параллельные ответвления.

Материалы и методы. Личинок цестод выделяли из брюшной полости зараженных мышей (Институт Паразитологии, Словакия). Червей плоско фиксировали в 4% параформальдегиде в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (PBS) плоско в течение 1 ч, затем промывали в течение 30 мин PBS с добавлением 1% тритона X-100 и далее фиксировали в течение 6 ч при 4 °С. Затем образцы переносили на хранение в 15% сахарозу на PBS для транспортировки в Институт биофизики клетки в контейнере с сухим льдом. Перед окраской образцы промывали 1 ч в PBS с добавлением 0,6% тритона, 0,1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% азида натрия (PBST), далее инкубировали с первичными антителами к серотонину (1:500, Abcam, США), растворенными в PBST в течение 4 сут., промывали в PBS, помещали на 3 сут. во вторичные флуоресцентно-меченные иммуноглобулины, после чего окрашивали фаллоидином (1:200) для идентификации мышечных филаментов. Тотальные препараты размещали на предметном стекле, в капле 75% глицерина под покровным стеклом. Анализировали с помощью флуоресцентного и конфокального лазерного сканирующего микроскопов LeicaDM6000 B, а также Leica TCS SP5 (LeicaMicrosystems, Германия). Для измерения морфологических параметров использовали программу AxioVisionRel 4.8.1.0. (Carl Zeiss), для измерения нейронов использовали 20 окрашенных тотальных препаратов цестод.

Результаты исследований. Длина тела тетратиридий *M. vogae* составила $842,73 \pm 88,99$ мкм, а ширина $576,01 \pm 55,03$ мкм ($n=9$), здесь и далее среднее арифметическое \pm стандартное отклонение, n – число измерений. Интенсивную серотонин-иммунопозитивную (-ип) окраску выявили в нейронах и волокнах, локализованных в центральных и периферических отделах нервной системы личинок (рис. 1). На головном конце тела *M. vogae* между четырьмя присосками расположены головные нервные ганглии. Впервые проведенная количественная оценка серотонинергических элементов показала, что размер головных ганглиев составил: ширина $90,79 \pm 13,03$, длина $92,70 \pm 17,42$ мкм ($n=15$). Размер серотониновых нейронов головных ганглиев – длина $9,67 \pm 2,06$, ширина $7,31 \pm 1,75$ мкм ($n=100$). Средние размеры серотониновых нейронов *M. vogae* – длина $9,84 \pm 1,97$, ширина $7,19 \pm 1,50$ мкм ($n=127$). Число серотонин-ип нейронов, которые удавалось подсчитать на одном изображении составило: в головном ганглии личинок *M. vogae* $21,17 \pm 4,12$ ($n=6$), а во всем теле $147 \pm 15,22$ ($n=6$).

Серотонинергические нейроны и волокна выявлены в трех парах хорошо окрашенных нервных стволов, соединенных серотонин-ип нервными комиссурами. Это боковые, спинные и брюшные нервные стволы (рис. 1б). Расстояние между боковыми нервными стволами $130,90 \pm 33,92$ мкм ($n=84$). Расстояние между нервными комиссурами $24,66 \pm 6,02$ мкм ($n=132$).

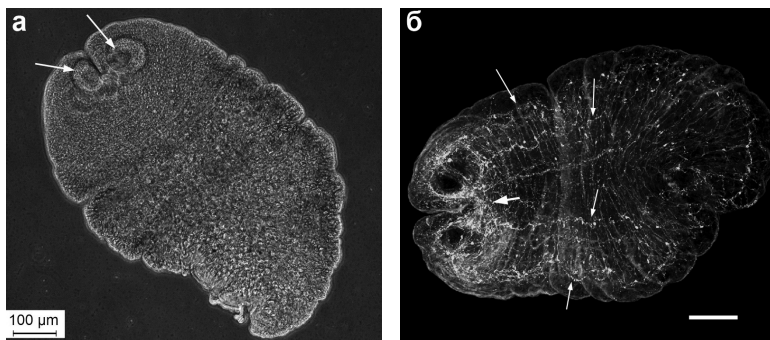


Рис. 1. *Mesocestoides vogae* тетратиридии, а – головной конец тела с присосками (стрелки), б – окраска серотонинергических компонентов нервной системы (зеленым), нервные стволы (тонкие стрелки), простирающиеся вдоль всего тела личинки, и головные ганглии (толстая короткая стрелка) между присосками

Для морфометрического анализа тело животного было условно разделено на три равные по длине части, обозначенные как первая треть тела (головной конец), вторая треть (средняя часть тела) и третья часть (задний конец тела). В головной части тела личинки *M. vogae* расстояние между нервными стволами составило $118,38 \pm 24,91$ мкм ($n=26$), расстояние между нервными комиссурами – $23,96 \pm 6,85$ мкм ($n=37$). Плотность расположения серотониновых нейронов и нервных комиссур в головном отделе тела была наибольшей. Наиболее яркое окрашивание к серотонину демонстрируют нервные комиссуры 1-й трети и 2-й трети тела личинок. Нейроны головной части (1/3) тела, локализованные вне головных ганглиев, расположены по ходу нервных стволов и нервных комиссур. В большинстве своем, это биполярные нейроны, имеющие более вытянутую форму, чем нейроны головного ганглия: длину $9,72 \pm 1,98$, и ширину $7,07 \pm 1,67$ мкм ($n=39$).

Для средней части тела (1/3) расстояние между нервными стволами составляет $147,34 \pm 43,33$ мкм ($n=19$), расстояние между комиссурами $25,45 \pm 5,78$ мкм ($n=48$). Серотониновые нейроны средней трети тела имеют длину $10,03 \pm 2,13$ мкм и ширину $7,06 \pm 1,54$ ($n=49$). Для задней трети тела личинки расстояние между нервными стволами составляет $129,30 \pm 32,77$ мкм ($n=20$), расстояние между нервными комиссурами $23,96 \pm 4,92$ мкм ($n=25$). Размеры нейронов задней части тела – длина $9,67 \pm 1,91$, ширина $7,42 \pm 1,24$ мкм ($n=33$).

Итак, самые крупные нейроны сосредоточены в 1-й трети тела животного. Самые мелкие – в задней части. Нейроны, расположенные по центру, имеют минимальную разницу длина-ширина по сравнению с остальными нейронами. Нейроны, расположенные в 1-й трети тела, имеют выраженную прямоугольную (или вытянутую) форму из-за их биполярности. Нейроны, расположенные в задней трети тела, имеют в основном неправильную форму (звезды, пятна). Наиболее интенсивную окраску демонстрируют нейроны 2-й трети тела животного, чуть слабее – нейроны 1-й трети, самую слабую окраску дают нейроны задней трети тела.

Заключение. Иммуноцитохимическая окраска тканей позволила идентифицировать серотониновые нейроны в нервной системе личиночной стадии развития цестод *M. vogae* – тетратиридии. Продемонстрировано наличие серотонина в центральных и периферических отделах нервной системы личинок. Проведенный микроскопический анализ позволил определить локализацию и морфологические характеристики серотонинергических нейронов. Морфометрические данные получены на большом числе измерений. Результаты могут иметь значение при рассмотрении вопросов эволюции нервной системы и нейромедиаторов у Platyhelminthes.

Список источников

1. Крещенко Н. Д. Изучение роли серотонина в мышечной функции у планарий // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. 2022. Т. 37. № 1. С. 34-44.
2. Hrckova G., Halton D. W., Maule A. G., Shaw Ch., Johnston C. F. 5-Hydroxytryptamine (serotonin)-immunoreactivity in the nervous system of *Mesocostoides corti* tetrathyridia (Cestoda: Cyclophyllidea) // J. Parasitol. 1994; 80(1): 144-148.
3. Terenina N. B., Reuter M., Gustafsson M. K. S. An experimental, NADPH-diaphorase histochemical and immunocytochemical study of *Mesocostoides vogae* tetrathyridia // Int. J. Parasitol. 1999; 29: 787-793.

4. Terenina N. B., Gustafsson M. K. S., Reuter M. Serotonin, reserpine and motility in *Mesocestoides* tetrathyridia. An experimental spectrofluorometry and immunocytochemistry study // *Parasitol. Res.* 1995; 81: 677-683.
5. Terenina N. B., Kreshchenko N. D., Movsesyan S. O. Musculature and neurotransmitters of internal organs of trematodes (the digestive, reproductive and excretory systems) // *Zoology.* 2022; 150: 125986.

References

1. Kreshchenko N. D. Study of the role of serotonin in muscular function in planarians. *Biological Membranes: Journal of Membrane and Cell Biology.* 2020; 37(1): 34-44. (In Russ.)
2. Hrckova G., Halton D. W., Maule A. G., Shaw Ch., Johnston C. F. 5-Hydroxytryptamine (serotonin)-immunoreactivity in the nervous system of *Mesocestoides corti* tetrathyridia (Cestoda: Cyclophyllidea). *J. Parasitol.* 1994; 80(1): 144-148.
3. Terenina N. B., Reuter M., Gustafsson M. K. S. An experimental, NADPH-diaphorase histochemical and immunocytochemical study of *Mesocestoides vogae* tetrathyridia. *Int. J. Parasitol.* 1999; 29: 787-793.
4. Terenina N. B., Gustafsson M. K. S., Reuter M. Serotonin, reserpine and motility in *Mesocestoides* tetrathyridia. An experimental spectrofluorometry and immunocytochemistry study. *Parasitol. Res.* 1995; 81: 677-683.
5. Terenina N. B., Kreshchenko N. D., Movsesyan S. O. Musculature and neurotransmitters of internal organs of trematodes (the digestive, reproductive and excretory systems). *Zoology.* 2022; 150: 125986.