

УДК 595.123.2 : 591.48

© 1994

**О РАСПРЕДЕЛЕНИИ КАТЕХОЛАМИНОВ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ  
П А Р А З И Т И Ч Е С К О Й Т У Р Б Е Л Л Я Р И И  
GRAFFILLA BUCCINICOLA (NEORHABDOCOELA: GRAFFILLIDAE)**

**Б. И. Иоффе**

Водно-глиоксильным (GAIF) методом получены данные о распределении катехоламинов (КА) у паразитической турбеллярии *Graffilla buccinicola* (Neorhabdocoela Dalyellioida: Graffillidae). Специфическая флуоресценция была выявлена во всех основных отделах нервной системы: мозге, стволах, кольцевой комиссуре и плексусе. Сходно с плоскими червями паразитических классов и в отличие от свободноживущих турбеллярий, GAIF-позитивные волокна отсутствовали в иннервации глотки и не было выявлено GAIF-позитивных биполярных клеток в иннервации переднего конца тела. Напротив, число и расположение GAIF-позитивных нейронов, связанных с латеральными стволами, было обычно для прямокишечных турбеллярий: таким образом, значительное увеличение размеров тела в связи с переходом к паразитизму на них не отразилось.

К настоящему времени распределение катехоламинов (КА) изучено у целого ряда представителей свободноживущих и паразитических плоских червей, а исследования методом жидкостной хроматографии высокого давления (HPLC) показали, что пул катехоламинов у них практически полностью образован дофамином (Reuter, Eriksson, 1991; Gustafsson, Eriksson, 1991). Гистохимическими методами были исследованы представители почти всех отрядов турбеллярий (Welsh, Williams, 1970; Hauser, Koopowitz, 1987; Reuter, Eriksson, 1991; Joffe, Kotikova, 1991; Joffe, 1991; Joffe, Reuter, 1993). Изучались и представители почти всех классов паразитических плоских червей (Keenan, Koopowitz, 1982; Gustafsson, Eriksson, 1991; Shishov, 1991). Эти исследования выявили значительное разнообразие в организации КА-эргического компонента нервной системы плоских червей и вместе с тем признаки специфические для отдельных таксонов (Joffe, Kotikova, 1991; Joffe, 1991). Однако вопрос о возможном влиянии паразитического образа жизни на КА-эргический компонент нервной системы плоских червей пока в литературе не обсуждался. Полезную информацию по этому вопросу могли бы дать сведения о паразитических представителях турбеллярий, но они до сих пор отсутствуют в литературе, если не считать малоспециализированного обитателя мантийной полости мидий *Urastoma suprinae* (Joffe, Kotikova, 1991). Недостаточность таких данных в значительной мере связана с тем, что относительно крупные размеры большинства паразитических турбеллярий в сочетании с неуплощенным телом очень затрудняют их изучение. В настоящей статье предлагается методический прием, позволяющий частично обойти эту трудность, и приводятся некоторые данные о распределении катехоламинов у паразитической турбеллярии *Graffilla buccinicola* Jameson, 1897 (Neorhabdocoela Dalyellioida: Graffillidae) из брюхоногого моллюска *Buccinum undatum*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Турбеллярии *Graffilla buccinicola* добывались из моллюсков *Buccinum undatum*, собранных с нижней литорали или из верхней сублиторали в августе—сентябре в районе Беломорской биологической станции ЗИН РАН «Картеш». Для изучения нервной системы использовались только половозрелые черви. Выявление катехоламинов проводилось водно-глиоксиловым (GAIF) методом (De la Torre, Surgeon, 1976). Черви инкубировались в течение 10 мин в растворе, содержащем 1 % глиоксиловой кислоты, нейтрализованной гидрокарбонатом натрия в 2 мМ HEPES буфере. Затем препараты высушивались в струе холодного воздуха, выдерживались 15 мин при 80°, заключались в вазелиновое масло и просматривались при помощи люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ И-2. Контроль реакции состоял в инкубации в среде без глиоксиловой кислоты и разрушении флюоресцирующего продукта реакции водой после прогревания.

Для получения относительно тонких препаратов по окончании первых 5 мин инкубации, когда ткани успевали несколько размягчиться, в животном делалось небольшое отверстие или надрез. Затем внутренние ткани аккуратно выдавливались наружу через проделанное отверстие и отмывались струей инкубационной среды из пипетки. Как показала специальная проверка, удаляемые ткани состояли почти исключительно из содержимого половых желез. Всего для морфологического описания было использовано 29 червей (не считая контроля).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Положительная реакция была обнаружена во всех основных элементах нервной системы: мозге, стволах, кольцевой комиссуре (единственной у *Graffilla*) и плексусе (рис. 1, а). Флюоресценция отсутствовала после контрольной инкубации в среде без глиоксиловой кислоты и гасилась при смачивании препаратов дистиллированной водой после термальной обработки: таким образом, свечение вызывалось специфической реакцией.

GAIF-позитивный нейропиль мозга развит слабо: ширина мозга практически не отличается по толщине от оснований нервных стволов (рис. 2, а; см. вклейку). В мозг посылают свои отростки униполярные нейроны С — это единственная пара клеток, ассоциированных с мозгом. Удаётся наблюдать до трех пар тонких GAIF-позитивных нервов, отходящих вперед от боковых участков мозга, но ни одна из них не содержит нервных клеток.

GAIF-содержащие волокна обильно представлены в латеральном и вентральном стволах (рис. 2, б, в) и в кольцевой комиссуре. Однако ганглиоподобные утолщения, которые расположены на вентральных стволах непосредственно перед кольцевой комиссурой и хорошо видны после проведения реакции на холинэстеразы (Котикова, Иоффе, 1988), при выявлении катехоламинов наблюдаются лишь у части особей. Последнее, по-видимому, указывает на различную степень концентрации КА-позитивных волокон в этой области. Дорсальные стволы менее богаты GAIF-позитивными волокнами. Дорсолатеральные продольные нервы удаётся наблюдать в виде очень тонких тяжей. Только один или два раза на препаратах наблюдались тонкие волокна, которые по расположению соответствовали дополнительным вентральным стволам. GAIF-позитивные волокна в составе плексуса имеют в основном поперечное или косое направление и по преимуществу связаны с нейронами L-группы (см. ниже). В глотке GAIF-позитивных структур зарегистрировано не было.

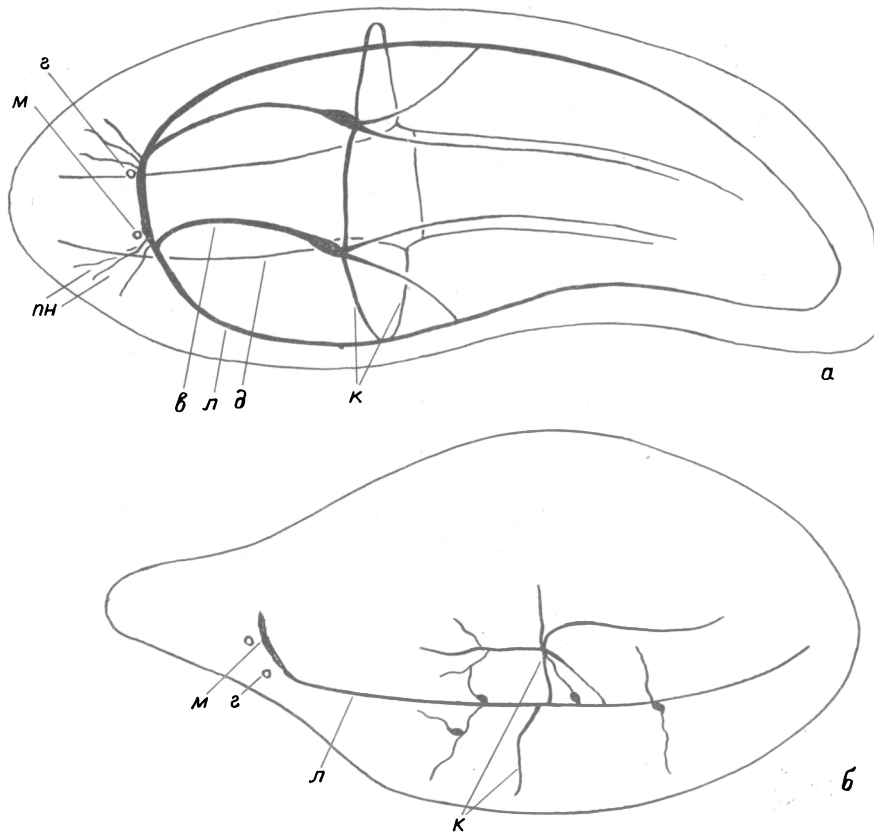


Рис. 1. Основные GAIF-положительные элементы в нервной системе *Graffilla buccincola*.  
 а — GAIF-положительные нервы (схематизировано); б — участок латерального ствола с плексусом и L-нейронами, выявленными у одного из исследованных червей; в — вентральные стволы; г — глаза; пн — ганглиоподобные утолщения; д — дорсальные стволы; к — кольцевая комиссура; л — латеральные стволы; м — мозг; пн — передние нервы.

Fig. 1. Main GAIF-positive structures in the nervous system of *Graffilla buccincola*.

На препаратах наблюдались GAIF-положительные нейроны, расположенные позади мозга. Нейроны L-группы (т. е. клетки, ассоциированные с латеральным стволом), выявленные у одного из исследованных экземпляров, показаны на рис. 1, б. При сравнении разных экземпляров легко опознается по крайней мере одна клетка, расположенная в непосредственной близости от кольцевой комиссуры, чаще сразу позади нее. Это биполярный нейрон, посылающий отростки в латеральный и в вентральный ствол, причем один из двух отростков часто входит в соответствующую часть кольцевой комиссуры между вентральным и латеральным стволами (рис. 2, б). Все остальные наблюдавшиеся перикарии клеток L-группы прилегали к латеральному стволу или располагались вблизи него (рис. 1, б; 2, в), их морфология варьировала. Уверенно узнавать эти клетки у разных экземпляров не удалось. Общее число L-клеток составляет 5 или несколько более. Еще по одному GAIF-положительному нейрону, видимо, располагается в основаниях дорсальных ствол.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Недостаток имеющихся в литературе сведений о катехоламинах у паразитических турбеллярий имеет в первую очередь методическую причину. За редкими исключениями специализированные паразитические турбеллярии — относительно крупные черви с округлым в сечении телом. Например, у зрелых особей исследованного в настоящей работе вида ширина тела в сокращенном состоянии может достигать 2 мм. При попытках же «расплющить» червей покровным стеклом они просто лопаются. Вследствие этого используемые в настоящее время методы выявления катехоламинов на целых животных позволяют получить лишь очень толстые препараты, что крайне затрудняет наблюдения с помощью люминесцентного микроскопа и фотографирование. Эту трудность удалось в основном преодолеть посредством препарирования червей, причем успешно осуществлять его неожиданно оказалось возможным только во время инкубации в растворе глиоксиловой кислоты. Предложенный метод позволяет получать достаточно тонкие препараты, но приводит к частому возникновению нежелательных разрывов стенки тела и существенно затрудняет ориентирование червей (в отношении положения дорсальной и вентральной сторон тела) на препаратах. По этой причине идентификацию и картирование всех ГАИФ-позитивных нейронов осуществить не удалось.

Топография нервной системы *Graffilla* была ранее детально описана по результатам выявления холинэстеразы (Котикова, Иоффе, 1988; Schell, 1988) и оказалась почти идентичной у разных видов рода. Приведенные выше данные показывают, что все выявляемые при реакции на холинэстеразы крупные нервы содержат также и КА-позитивные волокна. Исключение составляют дополнительные вентральные стволы, в которых КА очень мало или они отсутствуют. *Graffilla* имеет 4 пары стволоподобных продольных нервов, тогда как в норме и у свободноживущих, и у паразитических рабдоцелоидных плоских червей (кроме цестод, что явно вторично) имеется лишь три пары стволы. Ранее именно дополнительные вентральные стволы были расценены как новообразование за счет концентрации плексуса, что и обусловило применение термина дополнительные (Котикова, Иоффе, 1988). Данные по катехоламинам хорошо согласуются с такой трактовкой, поскольку истинные вентральные стволы у рабдоцелоидных плоских червей всегда богаты КА-позитивными волокнами. Однако, как было недавно показано (Joffe, Reuter, 1993), для более полного обсуждения гомологии стволы необходимы данные о нейронах, содержащих различные нейротрансмиттеры, в первую очередь серотонин.

Несмотря на неполноту, полученные данные о нейронах указывают на некоторые особенности нейронального состава, интересные для сравнения свободноживущих и паразитических плоских червей.

Во-первых, как уже отмечалось ранее, строение *L*-группы весьма постоянно в пределах таксонов различного ранга (Joffe, Kotikova, 1991; Joffe, 1991). Действительно, расположение и число клеток в *L*-группе у *Graffilla* вполне типично для рабдоцелоидных турбеллярий из подотрядов Turphloplanoida и Dalyellioida. Однако размеры *G. buccinicola* во много раз превышают размеры изучавшихся свободноживущих прямокишечных турбеллярий. Таким образом, увеличение размеров тела, несомненно связанное с переходом к эндопаразитизму, не отразилось на строении *L*-группы КА-эргических нейронов. У трематод и моногеней число *L*-нейронов также всегда невелико — независимо от размеров тела (Shishov, 1991).

Во-вторых, у *Graffilla* не было обнаружено КА-эргической иннервации глотки. Эта особенность резко отличает ее от свободноживущих турбеллярий, от малоспециализированной симбиотической турбеллярии *Urastoma*

(Joffe, Kotikova, 1991; Joffe, 1991), но сближает с трематодами и моногенеями, у которых такая иннервация также не обнаруживается (Shishov, 1991). У всех этих червей глотка имеет малые размеры, и функции ее, видимо, сводятся к перестальтическому прокачиванию пищи в кишку, что позволяет предполагать возможность упрощения ее иннервации.

В-третьих, у *Graffilla* не было обнаружено КА-позитивных биполярных нервных клеток, посылающих один отросток в мозг, а другой — к переднему концу тела, самостоятельно или в составе каких-либо нервов. Наличие таких нейронов весьма характерно для прямокишечных турбеллярий, но они не выражены у плоских червей паразитических классов, за возможным исключением *Khavia* (но не других цестод, см. Shishov, 1991).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант У3-04-6601).

#### Список литературы

- Котикова Е. А., Иоффе Б. И. Нервная система рабдоцелоидных турбеллярий *Graffilla* и *Pseudograffilla* в связи с их систематическим положением // Зоол. журн. 1988. Т. 67, вып. 11. С. 1621—1630.
- De la Torre J. C., Surgeon J. W. Histochemical fluorescence of tissue and brain monoamines: results in 18 minutes using sucrosephosphate-glyoxylic acid (SPG) method // *Neuroscience* 1976. Vol. 49, N 1. P. 456.
- Hauser M., Koopowitz H. Age-dependent changes in fluorescent neurons in the brain of *Notoplana acticola*, a polycladid flatworm // *J. of Experimental Zool.* 1987. Vol. 241, N 2. P. 217—225.
- Gustafsson M. K. S., Eriksson K. Localization and identification of catecholamines in the nervous system of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda) // *Parasitol. Research* 1991. Vol. 77, N 6. P. 498—502.
- Joffe B. I. On the number and spatial distribution of catecholamine-containing (GA-positive) neurons in some higher and lower turbellarians: a comparison // *Hydrobiologia* 1991. Vol. 227. P. 201—209.
- Joffe B. I., Kotikova E. A. Distribution of catecholamines in turbellarians (with discussion of neuronal homologues in the Platyhelminthes) // *Studies in Neuroscience* 1991. Vol. 13. P. 77—113.
- Joffe B. I., Reuter M. The nervous system of *Bothriomolus balticus* (Proseriata) — a contribution to the knowledge of the orthogon in the Plathelminthes // *Zoomorphology*, 1993. Vol. 113, N 2. P. 113—127.
- Keenan L., Koopowitz H. Physiology and in situ identification of putative aminergic neurotransmitters in the nervous system of *Gyrocotyle fimbriata*, a parasitic flatworm // *J. of Neurobiology* 1982. Vol. 13, N 1. P. 9—21.
- Reuter M., Eriksson K. Catecholamines demonstrated by glyoxylic-acid-induced fluorescence and HPLC in some microturbellarians // *Hydrobiologia* 1991. Vol. 229. P. 209—220.
- Schell C. The structure of the nervous system of *Graffilla pugetensis*, a parasite in the pericardial cavity of the bentose clam, *Macoma nasuta* // *J. of Parasitol.* 1989. Vol. 75, N 3. P. 428—430.
- Shishov B. A. Aminergic elements in the nervous system of helminths // *Studies in Neuroscience* 1991. Vol. 13. P. 113—137.
- Welsh J., Williams L. D. Monoamine-containing nerves of *Planaria* // *J. Comp. Neurol.* 1970. Vol. 138, N 1. P. 103—116.

ON THE DISTRIBUTION OF CATECHOLAMINES IN THE NERVOUS SYSTEM OF THE  
PARASITIC TURBELLARIAN GRAFFILLA BUCCINICOLA (NEORHABDOCOELA:  
GRAFFILLIDAE)

B. I. Joffe

*Key words:* catecholamines, nervous system, parasitic Turbellaria.

S U M M A R Y

Preliminary data about the distribution of putative catecholamines in a parasitic turbellarian, *Graffilla buccinicola* (Neorhabdoceola Dalyellioida: Graffillidae), were obtained using glyoxylic-acid-induced fluorescence (GAIF) method. All the main elements of the nervous system, i. e., the brain, cords, single ring commissure, and plexus, were GAIF-positive. Unlike free-living rhabdoceol turbellarians, but similarly to the parasitic platodes (the Neodermata), no GAIF-positive innervation of the small pharynx has been found in *G. buccinicola* and no GAIF-positive bipolar neurons have been observed in the innervation of the anterior pole of the body. These traits might be related to the parasitic mode of life. On the contrary, the set of GAIF-positive neurons associated with the lateral cords (L-group) is similar to that of the other studied representatives of the Typhloplanoida and Dalyellioida — thus, it was not much affected by a notable increase in the size of the body in comparison to free-living phabdoceols.

Вклейка к ст. Б. И. Иоффе

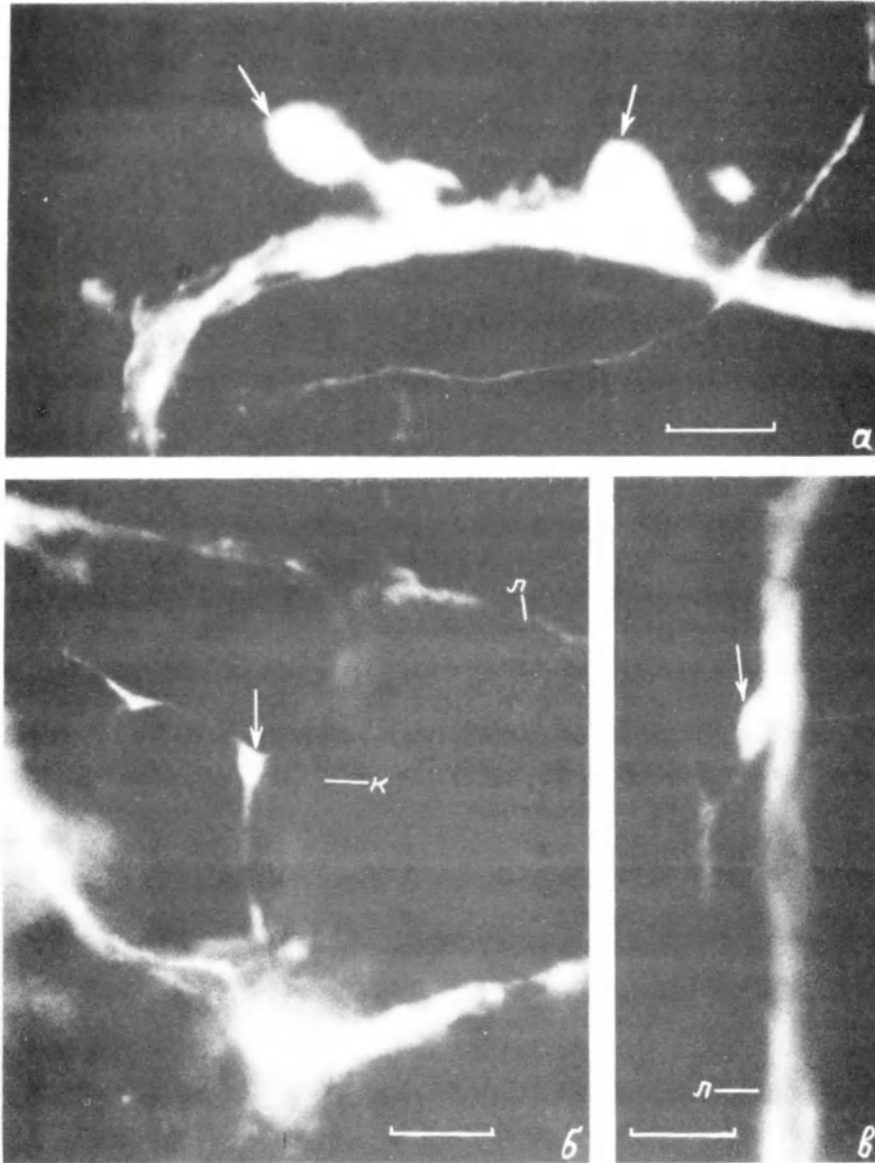


Рис. 2. GAIF-положительные нейроны *Graffilla buccinicola*.  
а — мозг и С-нейроны; б — L-нейрон, расположенный вблизи кольцевой комиссуры; в — L-нейрон из задней области тела. Перикарии нейронов указаны стрелками. Длина масштабной линейки — 15 мкм. Остальные обозначения, как на рис. 1.

Fig. 2. GAIF-positive neurons of *Graffilla buccinicola*.