

УДК 576.895.122

ИЗУЧЕНИЕ ДОЧЕРНИХ ГЕНЕРАЦИЙ РЕДИЙ *ECHINOSTOMA CAPRONI* (TREMATODA) В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ IN VITRO

© Г. Л. Атаев

Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена,
кафедра зоологии,
наб. р. Мойки, 48, С.-Петербург, 191186
E-mail: ataev@herzen.spb.ru
Поступила: 02.09.2014

С помощью метода культивирования *in vitro* получены данные о характере питания и размножении дочерних редий *Echinostoma caproni* (Richard, 1964). Отмечено, что в условиях *in vitro* объектом питания редий могут быть ткани моллюска *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), редии и церкарии лабораторных форм *Echinostoma daikensis*, *E. cameronensis* и *E. congoensis*, а также спороцисты и церкарии *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). Не наблюдалось случаев каннибализма дочерних редий *Echinostoma caproni* в отношении отрожденных ими редий. Хотя они могли питаться собственными церкариями. В среде с клетками Вге редии *E. caproni* постепенно переходят на питание этими клетками и отказываются от других объектов. Дочерние редии *E. caproni* в условиях *in vitro* способны формировать эмбрионы редий и церкарий. Однако случаев возврата редий с отрождения церкарий на отрождение редий не наблюдалось. Эти данные подтверждают результаты изучения партенит этого вида *in vivo* (Атаев и др., 2007).

Ключевые слова: Trematoda, редии, спороцисты, *Echinostoma caproni*, *E. daikensis*, *E. cameronensis*, *E. congoensis*, *Schistosoma mansoni*, *in vitro* культивирование.

Одной из основных причин, затрудняющих изучение партенит трематод, является внутримоллюсковый характер их развития. Любые исследования проводятся либо на срезах зараженного трематодами моллюска, либо сопровождаются вскрытием последнего с целью извлечения партенит. Однако вне моллюска-хозяина редии / спороцисты остаются жизнеспособными недолго (в лучшем случае несколько часов). Поэтому на протяжении последних десятилетий предпринимались многочисленные попытки подобрать искусственную среду для партенит (для культивирования *in vitro* марируют за основу успешно используется питательная среда для культивирования клеток позвоночных). Применялись различные жидкости, включая стандартные физиологические растворы, но в таких условиях удавалось наблюдать лишь развитие редий / спороцист дочерних генера-

ций. Осуществить трансформацию мирацидия в материнскую спороцисту, а также ее развитие до размножения не удавалось.

Переломным оказалось добавление в среду для культивирования эмбриональных клеток улиток *Biomphalaria glabrata* (Bge) (Hansen, 1976). Именно эти клетки оказались способными дополнить среду веществами, необходимыми для развития партенит. Предложенный метод был успешно применен для культивирования *in vitro* партенит разных видов трематод, включая материнскую генерацию (Coustau et al., 1997; Ataev et al., 1998; Ivanchenko et al., 1999).

В последующем основные исследования с использованием метода культивирования были направлены на постановку *in vitro* всего жизненного цикла. Это значительно расширило методические возможности при проведении экспериментальных исследований развития партенит и определении механизма действия факторов его регулирующих (Ye et al., 2013).

В отличие от наблюдения *in vitro* за процессом трансформации мирацидиев в материнские спороцисты и их последующим развитием, попытки культивирования разновозрастных партенит дочерних генераций предпринимались неоднократно (Smyth, 1990). Однако опытов по культивированию зрелых партенит в среде, содержащей клетки Bge, проведено немного (Basch, DiConza, 1977; Loker et al., 1999, и др.).

Целью экспериментов, результаты которых представлены в данной работе, стало изучение некоторых аспектов развития и поведения в условиях *in vitro* партенит дочерних поколений трематод *Echinostoma caproni* (Richard, 1964). В целом партеногенетические генерации этого вида представлены свободноживущей личинкой материнской спороцисты, материнской спороцистой, развивающейся в желудочке сердца моллюска; отраждаемыми ею материнскими редиями, способными формировать только эмбрионы дочерних редий. Дочерние редии способны отраждать как редий (в начале развития), так и церкарий — личинок марит. Для определения межвидовых особенностей поведения редий *E. caproni* в среду помещались партениты *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) и лабораторные формы *Echinostoma daikenaensis*, *E. cameronensis* и *E. congoensis*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Партениты всех видов были получены в результате вскрытия моллюсков через 13—34 дней после заражения (п. з.) мирацидиями. Предварительно моллюски на 1 ч помещались в воду, содержащую 1%-ный пенициллин, стрептомицин и фунгизон, после чего поверхность их раковин была обработана 70%-ным этиловым спиртом. Затем они были вскрыты в стерильных чашках в бессывороточной среде 199, разбавленной в два раза (Loker et al., 1992). С помощью стерилизованного пинцета или микропипетки партениты переносились в свежую среду и тщательно промывались от остатков тканей моллюсков в 5 %-ной бессывороточной среде 199 (Loker et al., 1992). Затем они помещались индивидуально или совместно в лунки (0.75 мл) 96-камерных кассет, заполненных за день до этого либо бесклеточной средой (синксеническая культура), либо клетками Bge

(аксеническая культура). С помощью буфера устанавливалось значение pH 7.4 ± 0.15 .

В работе была использована стандартная культура клеток Bge (Hansen, 1976) (American Type Culture Collection CRL 1494; Rockville, Maryland). В условиях лаборатории культура содержалась в 50 мл флаконах, помещенных в CO₂ инкубатор, при 26 °C и нормальном атмосферном давлении (Yoshino, Laursen, 1995).

Для культивирования партенит Bge-среда, обычно разбавлялась 0.5—10.0%-ной сывороткой (FCS/Sigma) и при этом в нее добавлялся гентамицин (4.3 мг/мл). Кассеты содержались в инкубаторе в темноте при температуре 26 °C. Всего в 47 лунок было помещено 212 реди *E. caproni*. В 41-й лунке среда содержала клетки Bge. В остальных лунках были различные комбинации среды (Bge или 199) FCS (0.5 или 10 %).

В зависимости от эксперимента использовали среды с модифицированным составом (Coustau et al., 1997; Ataev et al., 1998). Для предотвращения контаминации в нее добавляли различные антибиотики. В зависимости от задач эксперимента в питательной среде задавалась и поддерживалась определенная концентрация клеток Bge (количество клеток/мм²). Подсчет клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа (Leica DMIL/MPS 28-32) в трех полях (по 200 мкм²), выбранных по радиусу — от центра к краю камеры. Смену питательной среды производили еженедельно. Все эти манипуляции проводили в стерильном боксе с использованием бактерицидного освещения и воздушных фильтров.

В дальнейшем все лунки ежедневно просматривались под инвертированным микроскопом. Наблюдение продолжалось в течение 51 дня после помещения в искусственную среду (п. п. с.). Кроме этого в 11 лунок, содержащих клетки Bge, было помещено по одной дочерней редии *E. caproni* (из *Biomphalaria glabrata* через 27 дней п. з.) и *Echinostoma daikenaensis* (из *Biomphalaria forskalii* через 32 п. з.). Длительного культивирования остальных видов не проводилось. Партениты *Echinostoma cameronensis*, *E. congoensis* и *Schistosoma mansoni* помещались в ячейки со средой индивидуально, либо к редиям других видов на короткий срок.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты не позволили достоверно выделить среду, наиболее благоприятную для культивирования партенит, пересаженных из моллюсков. Удавалось наблюдать длительное выживание партенит и их потомства в различных вариантах сред. Более устойчивыми к условиям культивирования оказались редии *Echinostoma caproni*. К концу наблюдения (55 дней) живые редии (отрожденные *in vitro*) отмечались только в лунках, содержащих следующие типы среды: 199.0 % FCS; среда с клетками Bge (0.5 % FCS). В ходе наблюдения в условиях *in vitro* основное внимание уделялось развитию герминального материала партенит и их трофическому поведению.

В первые сутки п. п. с. отмечалась повышенная пищевая активность реди *in vitro* всех эхиностомных видов. В зависимости от качества среды эта активность могла быть направлена на самые различные объекты (рис. 1,

см. вкл.). Так, при наличии клеток Vge партениты, как правило, довольствовались ими и не обращали внимания на прочие объекты (рис. 2, А, см. вкл.). В отсутствие клеток Vge наблюдалось проявление хищничества в отношении тканей биомфаларий (например, гепатопанкреаса, рис. 1, А), спороцист *Schistosoma mansoni* (рис. 1, Б), дегенерирующих материнских и дочерних редий эхиностом (рис. 1, В), церкарий своего или чужого вида (рис. 1, Г, Д). Особенно агрессивными зарекомендовали себя дочерние редии *Echinostoma caproni*, для которых зарегистрированы все из перечисленных вариантов хищничества. Интересно отметить, что случаев каннибализма партенит в отношении отрожденных редий не зарегистрировано.

На основании наблюдений за размножением партенит можно сделать следующие обобщения.

В условиях *in vitro* редии *Echinostoma caproni* отрождают в среднем по 6 эмбрионов партенит или церкарий (рис. 2, Б). Максимальная плодовитость была отмечена для дочерних редий *E. caproni*, отрождавших с 9-го по 27-й день п. п. с. до 12 редий. На момент помещения в среду дочерние редии содержали 11 эмбрионов (не считая мелких, состоящих менее чем из 20—25 бластомеров). Важно отметить, что редии *E. caproni*, отрождающие церкарий в условиях искусственного культивирования, не возвращаются к формированию редий.

Наиболее крупными и развитыми во всех случаях оказывались особи, отрожденные в условиях культивирования первыми. Если это были эмбрионы церкарий, то они в отличие от последующих были способны к инцистированию. Однако различие в размерах среди новорожденных редий в дальнейшем может сглаживаться. Размеры редий, родившихся в культуре, могут за время эксперимента удваиваться и достигать 450×100 мкм. В ходе культивирования в них формируются эмбрионы (в наиболее развитых насчитывается до 10 зародышевых шаров). Интересно, что в условиях искусственной среды формируются редии с короткой кишкой и гипертрофировано крупной глоткой, занимающей от $1/3$ до $2/3$ тела (рис. 2, В, Г).

Эхиностомные редии в аксенической среде оказались способными не только обеспечить завершение развития крупных зародышей, но и эмбрионов, находящихся на момент помещения в среду на стадии 25—30 бластомеров.

Через несколько недель культивирования *E. caproni* интенсивность отрождения особей следующего поколения снижается: его длительность составляет теперь вместо 10 мин (как в первые сутки п. п. с.) часы и даже сутки, а в ряде случаев размножение остается незавершенным.

ОБСУЖДЕНИЕ

Сразу после перенесения зрелых редий в питательную среду они проявляют повышенную пищевую агрессивность. Она может быть направлена как на помещенных в эту среду вместе с ними партенит, так и на церкарий. Объектом нападения для редий могут оказаться и редии того же вида, и даже собственные церкарии (особенно активными в этом отношении зарекомендовали себя дочерние редии *E. caproni*). В то же время нами не наблюдалось случаев хищничества редий против отрождаемых ими парте-

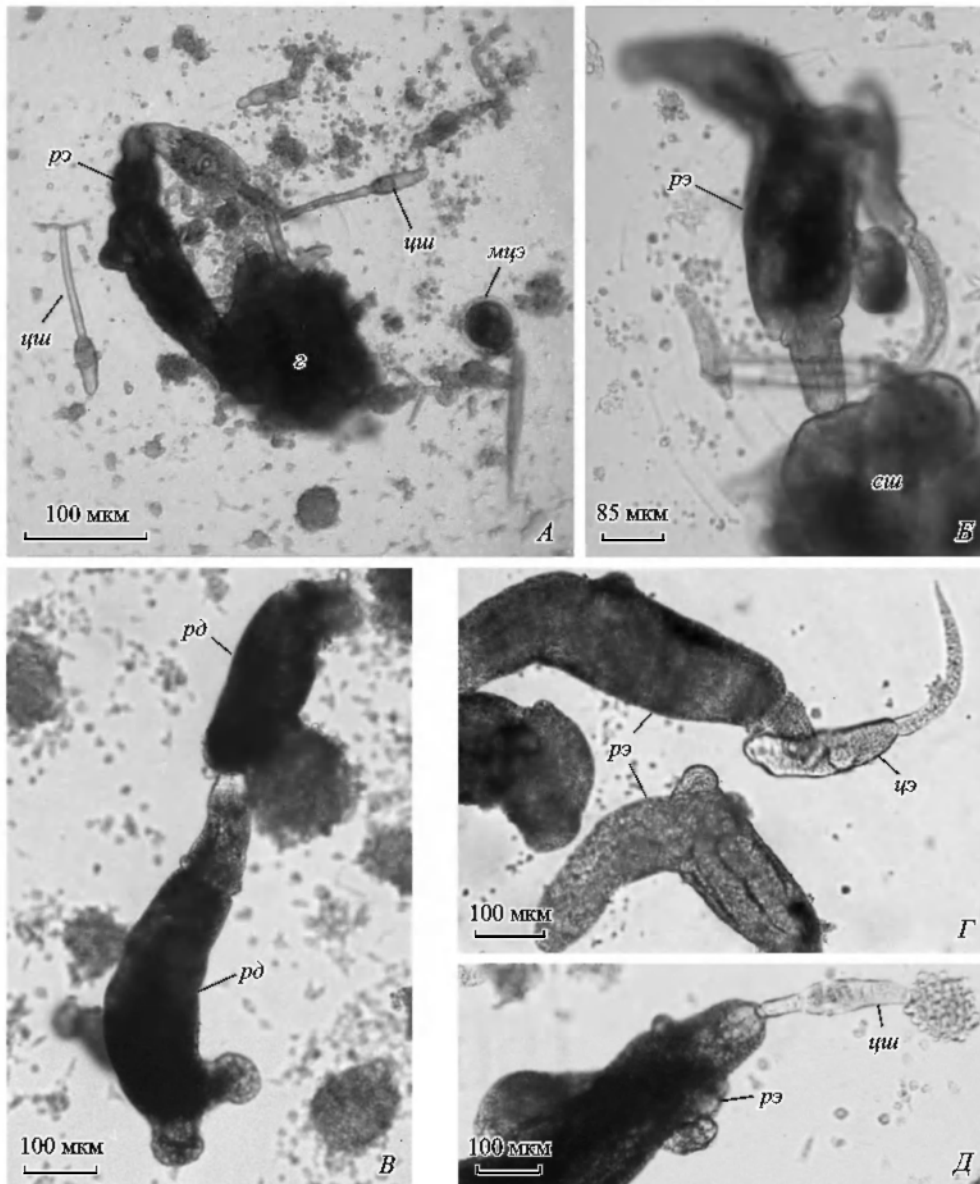


Рис. 1. Проявление *in vitro* хищничества дочерних редий *Echinostoma caproni* в отношении: (А) фрагмента гепатопанкреаса *Biomphalaria glabrata*, (Б) спорцисты *Schistosoma mansoni*, (В) редий *Echinostoma daikenaensis*, (Г) церкарий *E. caproni* и (Д) церкарий *S. mansoni*. з — гепатопанкреас; мцз — метацеркария *E. caproni*; рз — редии *Echinostoma daikenaensis*; рэ — редии *E. caproni*; су — спорциста *S. mansoni*; цш — церкарии *S. mansoni*; цэ — церкарии *E. caproni*.

Fig. 1. The feed of *Echinostoma caproni* daughter rediae *in vitro* with: (А) cells of *Biomphalaria glabrata* hepatopancreas tissue; (Б) *Echinostoma mansoni* sporocyst; (В) *Echinostoma daikenaensis* redia; (Г) *E. caproni* cercaria; (Д) *S. mansoni* cercaria.

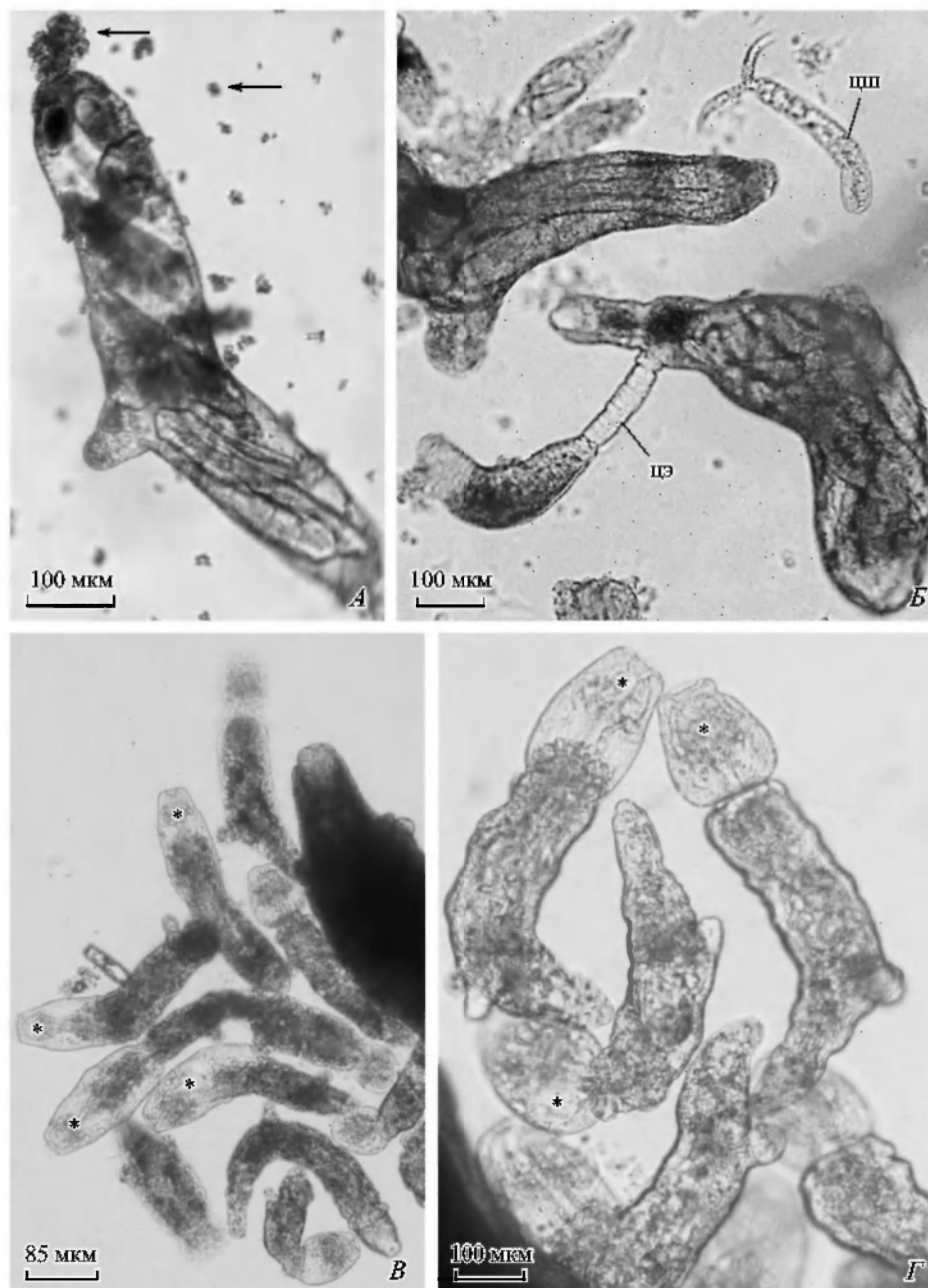


Рис. 2. (А) Дочерняя редия *Echinostoma caproni*, питающаяся клетками Вге (стрелка); (Б) отрождение церкарии *E. caproni* (цэ); (Б—Г) редии *E. caproni*, отрожденные в условиях *in vitro* (среда 199 с клетками Вге) дочерней редией, извлеченной из моллюска через 30 дней п. з. Звездочкой обозначены гипертрофированно увеличенные фаринксы редий. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 2. (A) Ingestion of Bge cells (arrow) by *Echinostoma caproni* daughter redia in vitro; (Б) cercaria coming out of the *E. caproni* redia; (Б—Г) progeny *E. caproni* redia realized from a refia taken from snail with 30 day-old infection and held in in culture with 199 medium and Bge cells fro 10 days.

Note enlarged pharynx (*) of rediae.

нит. Важно отметить, что присутствие в среде кусочков тканей моллюска или Vge-клеток заметно снижает агрессивность редий. Вообще через несколько дней пребывания в клеточной культуре редии полностью переключаются на заглатывания клеток и уже не проявляют интереса к соседствующим партенитам или личинкам.

Интересно, что в результате длительного пребывания в искусственной среде наблюдаются заметные изменения в строении пищеварительной системы. У взрослых редий они проявляются прежде всего в уменьшении относительной длины кишечника. Особенно заметны подобные изменения у редий, родившихся в условиях *in vitro*. Такие редии имеют небольшой кишечник и гипертрофированно развитый фаринкс, достигающий от 1/3 до 2/3 длины тела. Эти изменения, на наш взгляд, объясняются характером питания партенит. Возможно, переход на легко усваиваемую питательную среду делает ненужным наличие длинной кишки, необходимой для переваривания кусочков тканей моллюска при развитии *in vivo*. Гипертрофия глоточного отдела связана в первую очередь с ее независимым от других частей тела ростом. Очевидно, фаринкс способен достигать размеров, присутствующих в норме зрелым редиям, а размеры самого тела партенит, развивающихся *in vitro*, не достигают нормальных размеров (аллометрия). Последнее обстоятельство мы связываем не только с отставанием в соматическом росте редий, но и со слабым развитием герминального материала в искусственной среде. Как сообщалось ранее (Ataev et al., 1998), редии обладают растяжимыми покровами, соответственно рост эмбрионов приводит к увеличению размеров партенит.

Экспериментальные наблюдения за развитием партенит *in vitro* показали, что на протяжении всей активной жизни они нуждаются в постоянном получении питательных веществ. Следовательно, снижение концентрации питательных веществ в окружающей среде провоцирует партенит (прежде всего редий) на поиски новых пищевых источников. Это может выражаться как в поиске новых микробиотопов в организме хозяина, так и в проявлении каннибализма. Результатом повышенной агрессии становится не только скорое истощение энергетических ресурсов моллюска, но и органические изменения, приводящие к его гибели даже в случае возобновления питания. Скорость истощения энергетических ресурсов зависит от индивидуальных черт конкретной паразито-хозяинной системы и условий, в которых она существует. Такие данные были получены для моллюсков *Melanopsis praemorsa*, экспериментально зараженных *Philophthalmus rhionica* (Атаев, 1991).

Описание хищничества со стороны редий ряда видов в отношении партенит других видов приводится во многих работах (Lim, Heyneman, 1972; Moravec et al., 1974; Fashuyi, 1982, 1986; Mouahid, Mone, 1990, и др.). Однако случаи каннибализма отмечаются крайне редко и, очевидно, в условиях *in vivo* проявляются только в отношении старых, дегенерирующих особей. В то же время мы допускаем, что при определенных условиях редии некоторых видов могут нападать и на молодых партенит. В частности, А. А. Добровольскому (личное сообщение) удавалось наблюдать в кишечнике ряда эхиностоматидных партенит непереваренные остатки молодых редий *Poryphosmum radiatum*, *Echinoparyphium* sp. и *Echinochasmus* sp.

Наблюдения за размножением партенит дочерних генераций *Echinostoma caproni* в условиях *in vitro* интересны тем, что в них сохраняется характер развития герминального материала. Ранее подобные сведения были получены для материнских спороцист этого вида (Атаев et al., 1998). Кроме того, подтверждается предположение, что дочерние редии *E. caproni* после перехода на отрождение церкарий уже не способны вернуться к формированию редиоидных эмбрионов (Атаев и др., 2007).

Список литературы

- Атаев Г. Л. 1991. Развитие редий и церкарий *Philophthalmus rhionica* (Trematoda) в условиях голодания моллюска-хозяина. Паразитология, 25 (5): 456—461.
- Атаев Г. Л., Исакова Н. П., Добровольский А. А. 2007. Размножение партенит трематод *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae). Паразитология, 41 (6): 511—525.
- Атаев G. L., Fournier A., Coustau C. 1998. Comparison of *Echinostoma caproni* mother sporocyst development *in vivo* and *in vitro* using *Biomphalaria glabrata* snails and a *B. glabrata* embryonic cell line. Journ. of Parasitol. 84 (2): 227—235.
- Basch P. F., DiConza J. J. 1977. *In vitro* development of *Schistosoma mansoni* cercariae. Journ. of Parasitol. 63 (2): 245—249.
- Coustau C., Ataev G., Jourdane J., Yoshino T. P. 1997. *Schistosoma japonicum*: *In vitro* cultivation of miracidium to daughter sporocyst using a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line. Experimental Parasitology. 87 (2): 77—87.
- Fashuyi S. A. 1982, 1986. Field observations on the possibility of using echinostomes to control schistosome infections in snails. Egyptian Journ. of Bilharziasis. 9 (2): 89—93.
- Hansen E. L. 1976. A cell line from embryos of *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): establishment and characteristics. Invertebrate tissue culture: Research applications. Academic Press, New York, USA. 75—99.
- Ivanchenko M. G., Lerner J. P., McCormick R. S., Toumadje A., Allen B., Fischer K., Hedstrom O., Helmrich A., Barnes D. W., Bayne C. J. 1999. Continuous *in vitro* propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 96 (9): 4965—4970.
- Lin H. K., Heyneman D. 1972. Intramolluscan inter-trematode antagonism: Review of factors influencing the host-parasite system and its possible role in biological control. Advances in Parasitol. 81: 708—713.
- Loker E. S., Cimino D. F., Hertel L. A. 1992. Excretory-secretory products of *Echinostoma paraensei* sporocysts mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte functions. Journ. of Parasitol. 78: 104—115.
- Loker E. S., Coustau C., Ataev G. L., Jourdane J. 1999. *In vitro* culture of rediae of *Echinostoma caproni*. Parasite. 6 (2): 169—174.
- Moravec F., Barus V., Risavy B., Yousif F. 1974. Observation on the development of two echinostomes, *Echinoparyphium recurvatum* and *Echinostoma revolutum*, the antagonists of human schistosomes in Egypt. Folia Parasitologica. 21: 107—126.
- Mouahid A., Mone H. 1990. Interference of *Echinoparyphium elegans* with the host-parasite system *Bulinus truncatus*-*Schistosoma bovis* in natural condition. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 84 (4): 341—348.
- Smyth J. D. 1990. *In vitro* cultivation of parasitic helminthes. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, USA. 276 p.
- Ye Q., Dong H., Grevelding C. G., Hu M. 2013. *In vitro* cultivation of *Schistosoma japonicum* — parasites and cells. Biotechnology Advances. 31: 1722—1737.
- Yoshino T. P., Laursen J. R. 1995. Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (BGE) cells. The Journ. of Parasitol. 81 (5): 714—722.

THE STUDY OF DAUGHTER REDIAE ECHINOSTOMA CAPRONI (TREMATODA) IN VITRO CULTIVATION

G. L. Ataev

Key words: Trematoda, rediae, sporocysts, *Echinostoma caproni*, *E. daikenaensis*, *E. cameronensis*, *E. congoensis*, *Schistosoma mansoni*, *in vitro* cultivation.

SUMMARY

Methods of *in vitro* cultivation were used to examine the feeding and reproductive behaviors of daughter rediae of *Echinostoma caproni*. It was noted that under conditions of *in vitro* cultivation, rediae fed on tissues of the mollusc *Biomphalaria glabrata*, on rediae and cercariae of *E. daikenaensis* and *E. congoensis*, and on sporocysts and cercariae of *Schistosoma mansoni*. No cases of cannibalism of daughter rediae *E. caproni* by their offspring rediae were observed, although they could feed on their own cercariae. When kept in mediae containing (*B. glabrata* embryonic) Bge cells, rediae *E. caproni* gradually turned to feeding on these cells and stayed away other objects. Under conditions of *in vitro* cultivation, daughter rediae *E. caproni* were capable of forming redial and cercarial embryos. However, no cases of return from producing of cercariae to producing of rediae were observed. These *in vitro* data confirm the results of previous studies of this species's parthenitiae performed *in vivo* (Атаев и др., 2007).
