

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МУСКУЛАТУРЫ ТРЕМАТОДЫ *Fasciola hepatica*

© 2024 г. Н.Д. Крещенко*,[#]

*Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

[#]E-mail: nkreshch@rambler.ru

Поступила в редакцию 19.01.2024 г.

После доработки 19.05.2024 г.

Принята к публикации 03.06.2024 г.

Исследовано морфологическое строение и функциональные свойства мускулатуры у плоских червей *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae), опасного паразита сельскохозяйственных животных и человека. Окраску мускулатуры тела фасциол проводили гистохимически с помощью флуоресцентно меченого фаллоидина и анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Обнаружено наличие окраски в продольных, кольцевых и диагональных мышечных волокнах стенки тела червя, в кольцевых и диагональных мышечных волокнах, окружающих просветы разветвленного кишечника, а также в трубчатых мышечных структурах репродуктивного тракта. В брюшной и ротовой присосках трематоды обнаружены плотно упакованные и интенсивно окрашенные слои мышечных волокон. Физиологические исследования, проведенные на мышечных препаратах, полученных из *F. hepatica*, продемонстрировали наличие спонтанной сократительной активности мышечных препаратов. Нейропептид GYIRF, из семейства FMRFамид-подобных пептидов, примененный в ранге концентраций 1–10 мКМ, дополнительно стимулировал сокращение мышечных препаратов у *F. hepatica*, увеличивая частоту и амплитуду мышечных сокращений по сравнению с их базовой активностью. Полученные сведения будут использованы при дальнейшем изучении механизмов мышечного сокращения у паразитических червей, мускулатура которых является мишенью действия существующих антипаразитарных препаратов.

Ключевые слова: флуоресцентная микроскопия, гистохимия, мускулатура, паразитические плоские черви, FMRF-подобные пептиды.

DOI: 10.31857/S0006302924050134, EDN: NKPTBW

Одним из серьезных паразитарных заболеваний, распространенных повсеместно, не только в Российской Федерации, но и во всем мире, является фасциолез. Это заболевание вызывается печеночной двуусткой, *Fasciola hepatica* (класс Trematoda, тип Platyhelminthes). Фасциолы поражают мелкий и крупный рогатый скот, свиней, лошадей, верблюдов, оленей. Подвержены фасциолезу и дикие животные – кабаны, косули, олени, нутрии, бобры. Взрослые особи поселяются в желчных протоках печени и желчном пузыре, питаясь кровью и тканями организма-хозяина. В период миграции фасциолы могут находиться также в других органах – легких, сердце, лимфатических узлах, поджелудочной железе. [1]. Болезнь снижает продуктивность сельскохозяйственных животных и причиняет экономический ущерб животноводству не только в нашей стране [2], но и во всем мире [3, 4]. Фасциолезом заболевает и че-

ловек [5, 6]. Распространение болезни обусловлено повсеместным расселением промежуточного хозяина фасциолы *F. hepatica* – моллюска малого прудовика, который является главным звеном в циркуляции паразитических плоских червей. Для проникновения в тело промежуточного или основного хозяина и прикрепления к его тканям, а также локомоции, плавания их свободноживущих личиночных стадий, паразитические черви используют хорошо развитую мускулатуру тела [7]. В организме паразитических гельминтов мускулатура выполняет и другие важные функции, такие как двигательную, опорную, и защитную [8, 9]. Поэтому изучение строения и функционирования мускулатуры у плоских червей является важной задачей в паразитологии. Наиболее изученными в этом отношении оказались опасные паразиты человека и животных – шистосомы *Schistosoma mansoni* [10] и описторхи *Opisthorchis felineus* [11, 12]. Ранее также было исследовано строение мускулатуры тела у взрослых особей и

Сокращение: PBS – фосфатно-солевой буфер.

личиночных форм червей, среди которых: *Diplostomum pseudospathaceum* [13], *Himasthla elongata* [14] и *Diplodiscus subclavatus* [15].

Немного известно о физиологических свойствах мускулатуры и механизмах мышечного сокращения у плоских червей. По своему происхождению мускулатура этих животных относится к древним первичным мышечным тканям, развившимся из эпителиально-мышечных клеток предков многоклеточных. Мускулатура у них преимущественного гладкомышечного типа, клетки значительно меньше по размерам. Механизм мышечного сокращения клеток гладкой мускулатуры у плоских червей мало изучен, а полученные данные все еще разрознены. Поступление сократительного стимула (деполяризация, электрический ток, гормон) инициирует открытие кальциевых каналов в мембране мышечной клетки, а повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, через каскад внутриклеточных реакций вызывает сокращение мышечного волокна [16, 17]. Гладкомышечные клетки плоских червей, как и других животных, подвергаются воздействию нейромедиаторов, высвобождаемых из нервных окончаний, таких как серотонин, ацетилхолин и нейропептиды [11, 18, 19].

Для борьбы с паразитическими червями много лет используется ряд препаратов, обладающих направленным действием на мускулатуру тела, таких как празиквантел, триклабеназол, которые вызывают паралич мускулатуры и отторжение паразита из организма хозяина. В последнее время замечено, что паразитические плоские черви вырабатывают резистентность к празиквантелу и триклабеназолу [20–23]. Это обстоятельство диктует необходимость поиска новых антипаразитарных препаратов.

Настоящая работа посвящена изучению морфологии мускулатуры тела *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae), а также спонтанной и пептид-индуцированной сократительной активности мускулатуры. Проведение исследований по изучению морфологических, и функциональных свойств мускулатуры у представителей паразитических червей, а именно у опасного паразита человека и животных, trematodes *F. hepatica*, является актуальной задачей настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали взрослых половозрелых особей *F. hepatica* (Trematoda, Fasciolidae), длиной 15–20 мм. Материал был получен из печени, в результате забоя крупного рогатого скота на мясокомбинатах Белфаста (Великобритания), а также Московской области (Россия). Извлеченных из желчных ходов живых фасциол немедленно помещали в физиологический раствор при

37°C и отправляли в лабораторию, где их промывали в течение 3 ч перед исследованием.

Исследования выполнены в Институте биофизики клетки Федерального исследовательского центра «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» и в Королевском университете Белфаста, Великобритания (Queen's University Belfast, UK) и были ранее частично опубликованы в виде тезисов докладов [24].

Гистохимический метод идентификации актина. Для гистохимического окрашивания червей фиксировали плоско в свежеприготовленном 4%-м растворе параформальдегида (MP Biomedicals, США) на 0,1 М фосфатном буфере (PBS, pH 7,4, Amresco, США), в течение 24 ч при температуре 4°C, помещая между двумя предметными стеклами. После этого фиксированных животных помещали в 10%-й раствор сахарозы (Helicon, Россия) на PBS на 48 ч, затем заливали в Tissue Tek (США) и готовили фронтальные и поперечные срезы толщиной 12–14 мкм на криотоме Shandon Cryotomix E (Tertmoelectron Corporation, США) при –20°C. Срезы собирали на обработанные поли-L-лизином предметные стекла Polysine или Gold Super Frost Plus (Menzel-Glaser, Германия), высушивали на воздухе в течение 1 ч и хранили при –20°C до окрашивания. Перед окрашиванием срезы размораживали, промывали 3 раза по 5 мин в PBS и инкубировали в течение 6 ч с TRITC-(tetramethylrhodamine isothiocyanat)-меченым фаллоидином (Sigma, США) в концентрации 200 нг/мл в строго горизонтальном положении, во влажной затемненной камере при комнатной температуре. После финальной промывки 3 раза по 5 мин в PBS срезы покрывали 90%-м глицерином (Helicon, Россия) на PBS, накрывали покровным стеклом и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Микроскопия. Готовые окрашенные срезы тканей фасциол изучали с помощью флуоресцентного микроскопа DM6000 B (Leica Microsystems, Германия), соединенного с цифровой фотокамерой DC300F (Leica Microsystems, Германия). Использовали флуоресцентный фильтр возбуждающего света с длиной волны 515–560 нм (N2.1) для локализации флуорорхома TRITC. Микрофотографии, полученные с помощью микроскопа, сохраняли в виде файлов в формате TIFF. При создании иллюстраций использована программа Adobe Photoshop CS2 9.0. (Adobe Systems Inc., США). Измерение морфологических параметров мускулатуры проводили на изображениях фиксированных препаратов *F. hepatica*, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа, с помощью программы AxioVision Rel 4.8.1.0. (AxioVision, Carl Zeiss, Германия). Каждый морфологический параметр измеряли от

3 до 20 раз, вычисляли среднее \pm стандартное отклонение по числу измерений n .

Физиологические исследования. Только что извлеченные из желчных ходов живых фасциол помещали в физиологический раствор на 3–4 ч при 37°C. Для приготовления мышечных препаратов у *F. hepatica* удаляли передний участок тела с ротовой присоской и глоткой, а также боковые края и задний конец тела с брюшной присоской, таким образом получали серединный фрагмент мускулатуры длиной около 5 мм и шириной около 3.5 мм. Для изучения мышечного сокращения использовали физиологическую установку Королевского университета Белфаста, детально описанную ранее [25, 26]. Мышечный препарат помещали в камеру объемом 4 мл со средой HBSS (Gibco/BRL, Life Technologies, Paisley, Великобритания) при 37°C и прикрепляли между двумя присасываемыми пипетками — неподвижной и подвижной — на расстоянии 2.5–3.0 мм. Препараты оставляли на 15 мин для установления спонтанных ритмических мышечных сокращений. Если фрагмент мускулатуры не проявлял сократительной активности, препарат далее не исследовался.

Регистрировали амплитуду и частоту мышечных сокращений в течение следующих 10 мин в период, равный 2 мин и предшествующий каждой из временных точек: 0, 2, 5 и 10 мин после добавления тестируемого вещества. Опыты проводили при температуре при 37°C. Прикрепленные мышечные препараты оставляли в камере в течение 10–15 мин для установления устойчивых постоянных спонтанных сокращений, после чего в камеру осторожно добавляли исследуемое вещество (пептид). Движения, генерируемые мышцами между двумя пипетками, записывали на движущуюся масштабно-координатную бумажную ленту, затем треки анализировали. Физиологические эффекты нейропептида на мышечные препараты *F. hepatica* исследовали при добавлении свежеприготовленного раствора пептида GYIRF (Gly-Tyr-Ile-Arg-Phe-NH₂) (Immunogenetics, США). Пептид растворяли в деионизированной воде и хранили замороженными в мелких аликвотах, в концентрации 10⁻² М. В опыт пептид добавляли в ванночку (объемом 4 мл) с мышечным препаратом в концентрациях от 1 до 10 мкМ. В ходе анализа записанных треков, отражающих генерируемые мышечные сокращения, измеряли амплитуду и частоту спонтанных и индуцированных сокращений в течение 2 мин, предшествующих каждой временной точке: 0, 2, 5 и 10 мин. Анализ проводили для 6 и более мышечных препаратов, на которых тестировали каждую концентрацию пептида.

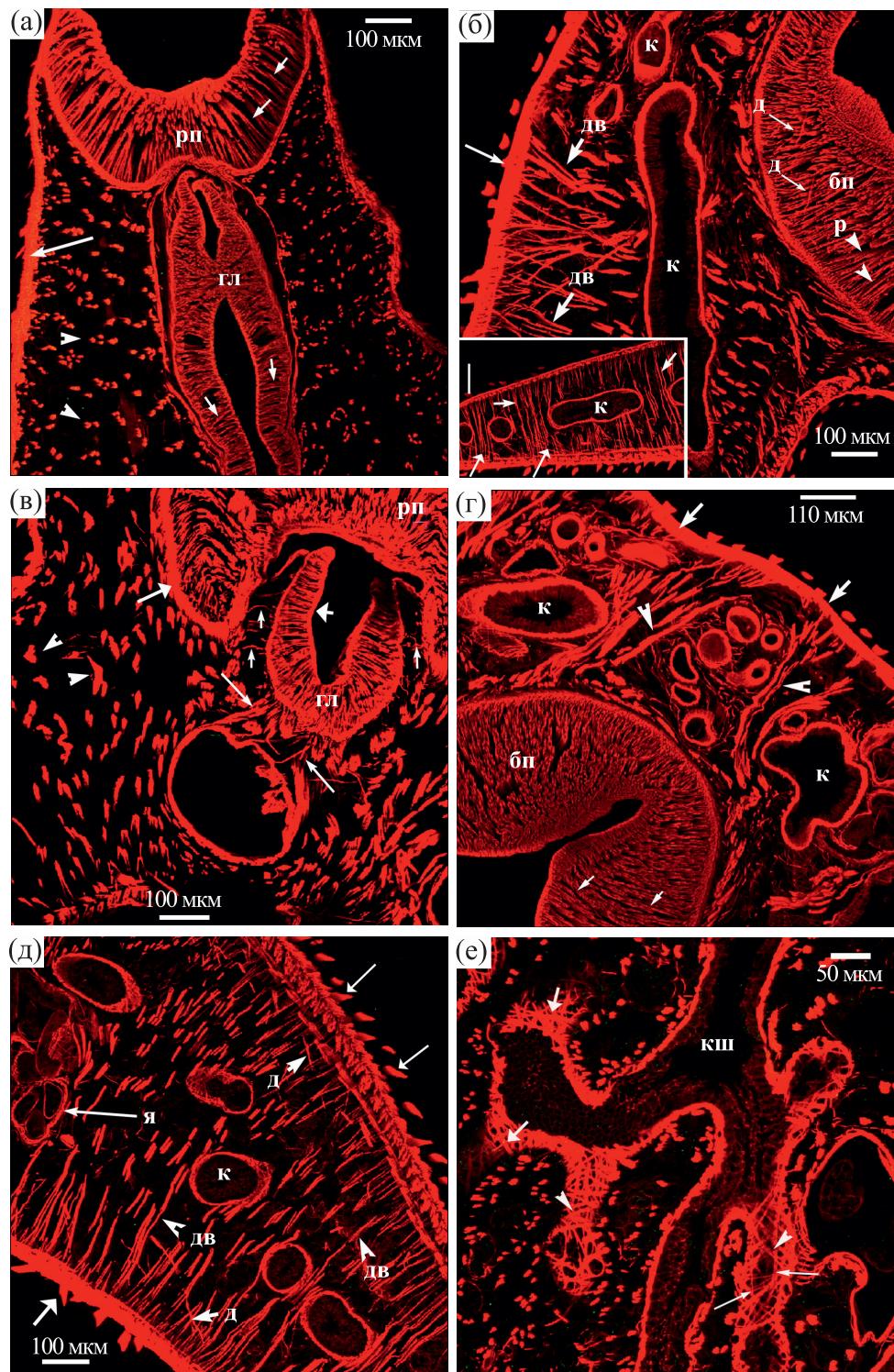
Результаты мышечных сокращений препаратов обрабатывали статистически, находя среднее

значение частоты и амплитуды мышечного сокращения и стандартное отклонение (или стандартную ошибку). Парный двухсторонний *t*-тест Стьюдента был использован для сравнения показателей амплитуды и частоты сокращений мышечного препарата в разные временные точки опыта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мускулатура. Окраска мускулатуры флуоресцентно-меченным фаллоидином выявила детали строения мускулатуры трематод *F. hepatica* и позволила произвести измерения некоторых ее морфологических параметров. Печеночная двусторка — трематода листовидной формы, размером от 2 до 3 см в длину и около 1 см в ширину. И спинная, и брюшная поверхности тела червя покрыты шипиками, которые были окрашены фаллоидином (рис. 1б,г,д), длина шипиков на спинной поверхности тела достигает 46.6 \pm 8.9 мкм ($n = 9$) мкм. Исследование показало сложную организацию мускулатуры тела *F. hepatica*. Мускулатура стенки тела состояла из кольцевых, продольных и диагональных мышечных волокон. Под наружными кольцевыми волокнами расположены продольные волокна, они формируют компактно упакованные слои (рис. 1б,д). Немногочисленные, пересекающиеся в двух направлениях диагональные волокна расположены за этими слоями мышц (рис. 1д). Толщина мышечной стенки тела 55.8 \pm 19.6 мкм ($n = 6$). Многочисленные дорзово-центральные мышечные пучки (рис. 1а–в) соединяют спинную и брюшную мышечные стенки, пронизывая все тело червя. Дорзово-центральные мышечные пучки состоят из 2–4 миофибрill и достигают средней толщины 10.2–12.8 мкм, иногда до 24.4–28.7 мкм. Расположены дорзово-центральные пучки мышц более или менее равномерно, расстояние между ними около 35.9 \pm 13.7 мкм ($n = 9$). В центральной части туловища дорзово-центральные пучки мышц огибают просветы кишечника.

Гистохимическая окраска фаллоидином выявлена в плотно упакованных мышечных волокнах специализированных прикрепительных органов фасциолы — в ротовой и брюшной присосках. Ротовая (рис. 1а,в) и брюшная (рис. 1б,г) присоски расположены в передней части тела и сближены. Обе они служат для прикрепления (присасывания) *F. hepatica* к тканям хозяина и поэтому сильно мускулинизированы (рис. 1а–г). Мускулатура ротовой присоски состоит из нескольких типов мышечных волокон — кольцевых, радиальных и продольных, ее толщина составляет около 193.3 \pm 45.2 мкм ($n = 3$). Наиболее развит слой радиальных мышечных волокон, соединяющих наружную и внутреннюю мышечные стенки ротовой присоски. Присоска имеет просвет, начиная-



ющийся ротовым отверстием, который ведет в цилиндрическую глотку (рис. 1а), а затем в кишечник, две ветви которого огибают брюшную присоску, расположенную на брюшной стороне в центральной части тела.

Брюшная присоска состоит из трех типов мышечных волокон – наружных кольцевых (называемых также экваториальными), наружных продольных (или меридиональных), внутренних кольцевых и радиальных. Мышечные слои

Рис. 1. Мускулатура тела трематоды *Fasciola hepatica* окрашенная TRITC-меченым фаллоидином; флуоресцентная микроскопия, замороженные срезы. (а) – Головной конец тела трематоды, продольный срез: радиальная мускулатура ротовой присоски и глотки (короткие стрелки), мускулатура стенки тела (длинная стрелка), а также дорзо-вентральные мышечные пучки (острия стрелок). (б) – Центральная область тела червя с брюшной присоской, поперечный срез: мускулатура стенки тела, спинная поверхность покрыта шипиками (длинная тонкая стрелка), дорзо-вентральные мышечные пучки (короткие толстые стрелки), просветы кишечника окружены фаллоидином-окрашенными мышечными волокнами, в брюшной присоске отмечены радиальные (острия стрелок) и диагональные мышечные волокна (тонкие стрелки); на вкладке – краевая область среза с дорзо-вентральными мышечными волокнами (короткие стрелки), и диагональными волокнами тела (тонкие тупые стрелки). (в) – Передний отдел тела с ротовой присоской и глоткой, продольный срез, дорзо-вентральные мышечные пучки отмечены (острия стрелок), мускулатура ротовой присоски (тупая длинная стрелка) и глотки (толстая короткая стрелка), отмечены мышцы, удерживающие глотку (короткие тонкие стрелки), а также продольные пучки мышц, соединяющие глотку с просветом кишечника (длинные тонкие стрелки) трематоды. (г) – Середина тела с брюшной присоской, поперечный срез, ветви кишечника окружены тонкими миофиламентами, радиальные волокна брюшной присоски отмечены короткими тонкими стрелками, также видны толстые пучки дорзо-вентральных мышечных волокон (острия стрелок), соединяющих спинную и брюшную поверхности тела, короткие толстые стрелки указывают на дорзальную мускулатуру тела с плотно упакованными миофиламентами. (д) – Центральная часть тела трематоды, поперечный срез, вентральная (толстая тупая стрелка) и дорзальная (тонкие стрелки) стенка тела червя с шипиками, толстый слой мускулатуры стенки тела интенсивно окрашен, плотно упакован и состоит из кольцевых, продольных, а также диагональных (отмечено короткими толстыми стрелками) мышечных волокон, дорзо-вентральные пучки мускулатуры тела состоят из нескольких мышечных волокон, соединяющих дорзальную и вентральную поверхности (острия стрелок), слева виден просвет матки, заполненный яйцами (тонкая стрелка), окруженный кольцевыми и диагональными мышечными волокнами; (е) – Мускулатура кишечника трематоды, центральная часть тела, продольный срез, отчетливо различимы неплотно упакованные продольные (длинные тонкие стрелки), кольцевые (короткие тупые стрелки) и диагональные мышечные волокна (острия стрелок), окружающие ветви кишечника. Сокращения: бп – брюшная присоска, гл – глотка, д – диагональные мышечные волокна, дв – дорзо-вентральные волокна, к – просвет кишечника, кш – кишечник, р – радиальные мышечные волокна, рп – ротовая присоска, я – яйца в просвете матки.

брюшной присоски *F. hepatica* плотно прилегают друг к другу (рис. 1б,г). Толщина мышечного слоя брюшной присоски на срезе около 340 мкм. Радиальные волокна брюшной присоски *F. hepatica* очень плотно упакованы. В брюшной присоске видны единичные диагональные (или хордальные) мышечные волокна (рис. 1б).

Глотка длиной 580–730 мкм, расположена в передней части тулowiща, имеет форму мускулистой трубки, ширина которой достигает 230.7 ± 35.9 мкм (SD), ($n = 10$). Толщина мышечного слоя глотки 79.1 ± 12.9 мкм ($n = 11$), просвет глотки 73.1 ± 19.3 мкм ($n = 6$). Мускулатура глотки представлена кольцевыми, продольными и радиальными мышечными волокнами (рис. 1а,в). Далее пищеварительный тракт фасциол разветвляется на две главные ветви кишечника, которые, направляясь к хвостовому отделу тела имеют многочисленные мелкие боковые ответвления и оканчиваются слепо. На продольных срезах видны ветви кишечника (рис. 1е). Мыщцы кишечника представлены очень тонкими 2.07 ± 0.77 мкм ($n = 5$), немногочисленными и нерегулярно ориентированными (кольцевыми и диагональными) мышечными волокнами. Диагональные волокна расположены в двух перпендикулярных направлениях, с расстоянием между ними около 5.3–7.2 мкм (рис. 1е). В мышечной выстилке кишечника *F. hepatica* впервые замечены немногочисленные, но довольно крупные, продольные мышечные волокна, которые не были описаны ранее (рис. 1е). На поперечных срезах (рис. 1б,г,д) просветы кишечника имеют округлую, овальную

форму или неправильную форму, с диаметром просвета на разных уровнях тела 94.9 ± 22.7 мкм ($n = 20$).

Половая бурса и половое отверстие расположены между развиликой кишечника и брюшной присоской. При исследовании срезов были обнаружены трубчатые структуры женской репродуктивной системы, вероятно, протоки матки, заполненные зрелыми яйцами (рис. 1д). Эти протоки на поперечных срезах имели неправильную лопастную форму, с диаметром просвета около 141.5 ± 8.4 мкм ($n = 4$) и были окружены по крайней мере продольными и кольцевыми мышечными волокнами.

Физиология мышечного сокращения. Физиологическое исследование, проведенное с использованием мышечных препаратов *F. hepatica*, показало, что мышечные препараты, изолированные у фасциол, проявляли спонтанную сократительную активность, характеризующуюся определенной частотой и амплитудой сокращения (рис. 2а). После установления спонтанной сократительной активности на препараты действовали пептидом GYIRF. В концентрациях 5 мкМ (рис. 2б) и 10 мкМ (рис. 2в) пептид оказывал возбуждающее действие на сокращение мышечных препаратов.

Перед нами встало задание определения минимальной действующей концентрации пептида. Для этого измеряли амплитуду и частоту сокращений в течение 1 мин, предшествующей каждой временной точке. Нулевой точке соответствовало время добавления пептида и начала инкубации мышечного препарата с пептидом. Оказалось, что

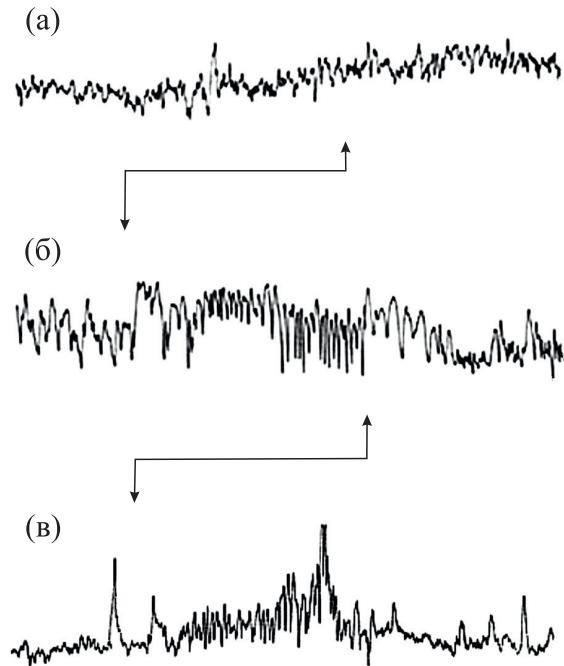


Рис. 2. Треки спонтанного сокращения мышечного препарата *F. hepatica* без добавления пептида (а), пептид-индуцированное возбуждающее действие после добавления GYIRF в концентрациях 5 мкМ (б) и 10 мкМ (в).

во всех концентрациях (от 1 мкМ, 5, 7 и 10 мкМ) пептид GYIRF оказывал возбуждающее влияние на сокращение мышечных препаратов фасциол хотя бы в одной из временных точек эксперимента — через 2, 5, и 10 мин после начала воздействия (или добавления пептида). Так, в концентрации 7 мкМ пептид GYIRF увеличивал и частоту ($n = 11$) и амплитуду сокращений ($n = 10$) мышечных препаратов фасциол. В концентрации 5 мкМ пептид статистически значимо увеличивал как частоту (в точках 5 и 10 мин), так и амплитуду сокращений через 10 мин инкубации (рис. 3а, б). В концентрации 1 мкМ нейропептид GYIRF оказывал положительное влияние, но только на частоту сокращения мышечных препаратов фасциол через 5 и 10 мин после его добавления ($n = 6$). Таким образом, концентрация 5 мкМ была определена как минимальная действующая концентрация (при которой влияние достигает уровня достоверности в большинстве точек, а также наблюдается воздействие на оба показателя — как на частоту, так и на амплитуду сокращения). Эту концентрацию мы будем использовать в экспериментах по изучению деградации нейропептида GYIRF после его воздействия на мышечные препараты (предмет дальнейшей работы).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании гистохимическое окрашивание препарата флуоресцентно меченым

фаллоидином в сочетании с флуоресцентной микроскопией использовалось для визуализации мышечных волокон у трематод *F. hepatica*. Это современный гистохимический метод, в котором фаллоидин, получаемый из ядовитого гриба *Amanita falloides*, используется в качестве специфического маркера для окраски актина. Известно, что глобулярный белок актин может полимеризоваться в филаменты F-актина [27], которые участвуют в клеточных процессах, таких как сокращение мышц, цитокинез [28], транспорт молекул [29]. Фаллоидин специфически связывается с молекулой актина, а производные фаллоидина, меченные флуорофорами, обычно используются для визуализации F-актина в различных областях исследований [30]. Впервые этот гистохимический метод был использован в конце прошлого столетия для изучения распределения миофиламентов в мускулатуре плоских червей [31, 32]. Актин является важным белком, который может обеспечивать множество физиологических процессов в организме плоских червей, например, быть вовлеченным в движение секреторных везикул, в мышечное сокращение, цитокинез и сохранение формы клетки [33].

После инкубации гомогенатов тканей фасциол с моноклональными анти-актиновыми антителами, с помощью гель иммуноэлектрофореза была идентифицирована наиболее интенсивная полоска, соответствующая актину с мол. весом 43 кДа. Локализация этой молекулы в организме червя с помощью иммуноцитохимического мето-

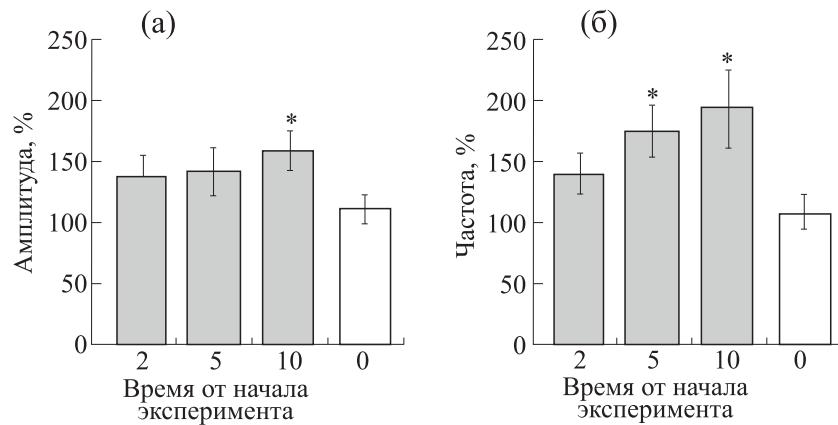


Рис. 3. Диаграмма значений амплитуды (а) и частоты (б) сокращения мышечных препаратов трематод при воздействии GYIRF в концентрации 5 мкМ, среднее значение и стандартное отклонение (SD). По оси ординат – процент числа сокращений по отношению к точке «0» (точка добавления пептида); по оси абсцисс – время от начала эксперимента – 2, 5 и 10 мин после добавления пептида, «0» – отмывка препарата от пептида после 10 мин инкубации. Число повторных измерений (подсчетов) для амплитуды: 2 мин ($n = 19$), 5 мин ($n = 19$), 10 мин ($n = 9$), отмывка ($n = 9$); для показателя частоты сокращения: 2 мин ($n = 16$), 5 мин ($n = 9$), 10 мин ($n = 9$), отмывка ($n = 9$). * – Достоверность различий средних, критерий Стьюдента (two-tailed) для доверительного интервала 95% при сравнении с точкой отмычки препарата: для амплитуды (а) – 10 мин ($p < 0.0244$); для частоты (б) – 5 мин ($p < 0.0316$), и 10 мин ($p < 0.0351$).

да показала, что эта форма актина входит в состав субтегументальной мускулатуры *F. hepatica* [33].

Гистохимический метод выявления фибрillярного актина с помощью фаллоидина, меченного флуоресцентным зондом TRITC, и применения флуоресцентной микроскопии позволил нам идентифицировать и охарактеризовать некоторые детали морфологического строения мускулатуры трематоды *F. hepatica*, а также впервые провести морфометрические измерения некоторых компонентов мускулатуры этих паразитических червей.

Полученные результаты показали, что мускулатура стенки тела фасциол отличается упорядоченным устройством – регулярным расположением наружных кольцевых, промежуточных продольных и внутренних диагональных мышечных волокон. Кольцевые (или экваториальные), меридиональные (или продольные) и радиальные мышечные волокна присутствуют в стенке как ротовой, так и брюшной присосок. Мышцы кишечного тракта представлены в основном диагональными, идущими в двух направлениях мышечными волокнами. Результаты показали, что общее строение мускулатуры и последовательность расположения мышечных слоев у *F. hepatica* согласуется с предыдущими исследованиями. Так, при изучении тотальных препаратов фасциол, были описаны наружные кольцевые, промежуточные продольные и внутренние диагональные мышечные волокна в мускулатуре тела [34]. В ротовой и брюшной присосках, в мужских и женских отделах репродуктивной системы *F. hepatica* отмечены преимущественно радиальные мышечные волокна [34]. Для других видов па-

зитических червей, например, *Schistosoma mansoni* [10], *Vicephalooides gracilescens* [35], *Diplostomum pseudospathaceum* [7, 13] также характерен общий с *F. hepatica* паттерн расположения слоев мускулатуры тела. Ранее было выявлено, что мышечные волокна фасциол, относящиеся к двум главными мышечными слоям стенки тела (кольцевым и продольным), являются гладкомышечными клетками с клеточным телом и ядром. Тела мышечных клеток расположены внутри под продольным мышечным слоем и соединены с соответствующим мышечным волокном коротким цитоплазматическим мостиком [36]. Нам впервые удалось у *F. hepatica* выявить продольные мышечные волокна в стенке кишечника, а также выявить хордальные мышечные волокна в брюшной присоске и провести измерение морфологических параметров мускулатуры тела фасциол, таким образом, дополнить и обогатить имеющиеся в отношении *F. hepatica* сведения.

У представителей плоских червей (Platyhelminthes) были выделены и синтезированы четыре FMRFамил-подобных пептида, из них GNFFRF у цестод [37], RYIRF, GYIRF и YIRF у планарий [38-40]. FMRFамил-подобные пептиды – это короткие молекулы, состоящие из 2–10 аминокислотных остатков и обладающие типичным амидированным R(K)-X1-R-X2-NH₂ C-концевым мотивом, где первая аминокислота всегда является щелочным основанием, таким как аргинин (R = Arg) или лизин (K = Lys), X1 может быть лейцин (L = Leu), треонин (T = Thr) или пролин (P = Pro), а X2 всегда ароматический аминокислотный остаток, такой как фенилаланин (F = Phe) или триптофан (W = Trp).

После того, как были синтезированы специфические антитела, их применение позволило обнаружить позитивную иммуноокраску к FMRFамид-подобным пептидам в нервной системе паразитических и свободноживущих плоских червей – у трематод и планарий [7, 41]. Иммуноцитохимически позитивная окраска к нейропептиду FMRFамиду была обнаружена в головном нервном ганглии *F. hepatica* и трех парах продольных нервных стволов и соединяющих их комиссур [42]. В периферической нервной системе фасциол GNFFRF-иммунопозитивную окраску наблюдали в нервных сплетениях, расположенных в мускулатуре стенки тела, ротовой и брюшной присосок [43]. Кроме того, у *F. hepatica* электронная микроскопия с применением иммуномечения показала внутриклеточную локализацию пептида в цитоплазме меченых золотом GNFFRF-иммунопозитивных нейронов [43]. Мечение пептида золотом наблюдали на поверхности плотных, а также эллипсоидных электронно-плотных везикул с гомогенным матриксом, присутствующих в телях FMRF-иммунопозитивных нервных клеток, а также в малых и гигантских нервных отростках мозговых ганглиев, по-перечных нервных комиссур и главных нервных стволов [44]. При этом надо отметить, что до сего-дняшнего дня ни один природный FMRFамид-подобный пептид не был выделен из тканей *F. hepatica*.

Широкое распространение в нервной системе FMRF-иммунопозитивных нейронов и их отростков, а также специфическая их локализация в толще мускулатуры тела и мускулатуры прикрепительных органов паразитических червей [45] позволили предположить фундаментальную роль FMRF-подобных пептидов в нервно-мышечной физиологии. Изучение сократительной активности мускулатуры у плоских червей, а также ее регуляции, привлекло особое внимание ученых. Перед научным сообществом стояла задача разработки антипаразитарных препаратов, которые бы избирательно воздействовали на мускулатуру представителей *Platyhelminthes*.

В самом деле, первые опыты по выявлению мышечной активности FMRFамид-подобных пептидов были проведены на целых червях и их личинках. Так, добавление пептидов семейства FMRFамид-подобных, как было показано, не оказалось влияния *in vivo* на двигательную активность целых (интактных) червей *Schistosoma mansoni* [46]. Этот факт авторы объяснили тем, что FMRF-подобные пептиды не проникали через плотные покровы червей, или, возможно, разрушались пептидазами. Однако у другого вида, цестода *Mesocestoides vogae*, было обнаружено, что пептиды GNFFRF, GYIRF и YIRF оказывали стимулирующее влияние на подвижность личинок [18, 47].

Дальнейшие исследования пошли по пути выделения фрагментов мускулатуры тела (мышечных препаратов). Начатые исследования показали, что FMRFамид-подобные пептиды (такие как YIRF, GYIRF, RYIRF, GNFFRF, и FLRF) оказывали возбуждающее влияние на препараты моногеней *Diclidophora merlangi*, у которых были обрезаны боковые края [48]. У фасциол также были проведены исследования с использованием мышечных препаратов. Было обнаружено, что GNFFRF не оказывал влияния на мускулатуру тела *F. hepatica* [49], однако другие пептиды, такие как FMRF, RYIRF, YIRF, GYIRF [49, 50], как и ряд пептидов, выделенных к тому времени у нематод, таких как SDPNFLRF, SADPNFLRF, KNEFIRF, KSAYMRF, KHEYLRF и KPNFIRF [51], оказывали возбуждающее действие на мускулатуру фасциол, демонстрируя кросс-филетическую активность FMRFамид-подобных пептидов.

Результаты настоящего исследования продемонстрировали возбуждающее действие пептида GYIRF на мышечные препараты *F. hepatica*. Проведенные опыты позволили определить рабочие концентрации пептида (1–10 мкМ), а также выявить минимальную активную концентрацию в 5 мкМ, которая используется в дальнейших экспериментах, по изучению деградации FMRFамид-подобных пептидов.

Большинство исследований индуцирующего влияния FMRFамид-подобных пептидов проводилось на паразите крови человека, кровяной двуустке *S. mansoni*. Это связано с тем, что сами шистосомы очень маленького размера и легко содержатся в культуре в лабораторных мышах. Из шистосом впервые удалось выделить и отдельные мышечные жизнеспособные клетки [52]. На изолированных мышечных клетках *S. mansoni* было показано возбуждающее действие пептидов RYIRF, GNFFRF [46], YIRF и GYIRF [53, 54]. Таким образом, FMRFамид-подобные нейропептиды оказывали у шистосом дозозависимое влияние на сокращение индивидуальных мышечных волокон [46, 54]. Физиологический механизм, посредством которого FMRFамид-подобные пептиды реализуют сократительное действие на изолированные мышечные волокна шистосом, пока полностью не раскрыт, хотя и установлено, что для проявления биологической активности нейропептиды должны иметь амидированный С-терминальный остаток, а инкубационная среда обязательно должна содержать внеклеточный Ca^{2+} [46]. Мышечные клетки также были изолированы и у свободноживущих червей *Baelloura candida* [55] и *Procerodes littoralis* [56]. У этих видов пептиды GYIRF, RYIRF [40, 56], а также YIRF вызывали сокращение индивидуальных мышечных волокон [56]. Обнаруженное действие на

изолированные мышечные клетки [46, 48, 54] явилось демонстрацией их прямого возбуждающего влияния, и утвердило роль нейропептидов семейства FMRFамид-подобных в нейромышечной передаче у плоских червей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря пониманию сложного морфологического строения мышечной системы у паразитических плоских червей, а также функциональной активности их мускулатуры, в дальнейшем можно исследовать механизмы регуляции мышечной функции у разных представителей паразитических червей.

В результате проведенных исследований происходила отработка подходов к изучению спонтанного и пептид-индуцированного мышечного сокращения у плоских червей. Установлен факт воздействия FMRF-подобного пептида, GYIRFамида, на мышечные препараты фасциол, и минимальная действующая концентрация пептида. Эти сведения будут использованы в ходе дальнейших экспериментов.

Способом ограничения паразитарной инвазии может стать создание новых антипаразитарных препаратов, вызывающих уменьшение (или паралич) двигательной активности червей и открепление их от биологического субстрата. Это, в конечном счете, будет способствовать снижению паразитарной инвазии их хозяев – человека и животных, и загрязнения окружающей среды.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность профессору А.Г. Молу (Prof. A.G. Maule) и профессору Д.В. Халтону (Prof. D.W. Halton) Королевского Университета г. Белфаста (Queen's University of Belfast, Northern Ireland, UK) за предоставленную возможность работать в лаборатории, а также А. Моусли (Dr. A. Mousley) за помощь в освоении методики изучения физиологии мышечного сокращения и работе на физиологической установке. Для микроскопического исследования было использовано оборудование Королевского Университета (Белфаст, Великобритания), а также Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ПНЦБИ РАН (Пущино, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работы в Институте биофизики клетки РАН выполнены в рамках Государственного задания № 075-00609-24-01.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бронштейн А. М., Малышев Н. А., Федянина Л. В. и Давыдова И. В. Фасциолез с длительным бессимптомным течением у больного из Туркменистана, осложнившийся острой механической желтухой: описание случая и обзор литературы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*, **21** (2), 92–98 (2016).
- Сафиуллин Р. Т. Распространение и экономический ущерб от основных гельминтозов жвачных животных. *Ветеринария*, **6**, 28–32 (1997).
- Alba A., Grech-Angelini S., Vázquez A. A., Alda P., Blin Q., Lemmonier L., Chauvin A., Chartier C., Douchet P., Hurtrez-Boussès S., Rey O., Foata J., Boissier J., and Quilichini Y. Fasciolosis in the mediterranean island of Corsica (France): insights from epidemiological and malacological investigations. *Food Waterborne Parasitol.*, **30**, e00188 (2023). DOI: 10.1016/j.fawpar.2023.e00188
- Nyagura I., Malatji M. P., and Mukaratirwa S. Occurrence of *Fasciola* (Digenea: *Fasciolidae*) species in livestock, wildlife and humans, and the geographical distribution of their intermediate hosts in South Africa – a scoping review. *Front. Vet. Sci.* **9**, 935428 (2022). DOI: 10.3389/fvets.2022.935428
- Романенко Н. А., Горохов В. В., Сергиев В. П., Колесникова М. А., Успенский А. В., Молчанов И. А., Гурьева С. С. и Горохова Е. В. Заболеваемость фасциолезом человека. *Медицинская паразитология и паразитарные болезни* **2**, 57–59 (2008).
- Никонорова М. А., Волчкова Е. В., Хорошилова И. А., Киушкина И. Н., Немилостива Е. А. и Арсеньева И. В., Трудности ранней диагностики у человека (описание клинического случая). *Эпидемиология и инфекционные болезни*, **1**, 44–49 (2018).
- Теренина Н. Б. и Густафссон М. К. С. *Функциональная морфология нервной системы паразитических плоских червей* (Товарищество научных изданий КМК, М., 2014).
- Толстенков О. О., Прокофьев В. В., Теренина Н. Б., Галактионов К. В., Действие некоторых фармакологических веществ на двигательную активность церкарий *Cryptocotyle lingua* (Heterophyidae). *Паразитология*, **4**, 346–370 (2010).

9. Halton D. W. and Maule A. G. Flatworm nerve-muscle: structural and functional analysis. *Can. J. Zool.*, **82**, 316–333 (2004).
10. Mair G. R., Maule A. G., Day T. A., and Halton D. W. A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, **121** (2), 163–170 (2000).
11. Tolstenkov O. O., Terenina N. B., Serbina E. A., and Gustafsson M. K. S. The spatial relationship between the musculature and the 5-HT and FMRFamide-immunoreactivities in cercaria, metacercaria and adult *Opisthorchis felineus* (Digenea). *Acta Parasitologica*, **55**, 123–132 (2010). DOI: 10.2478/s11686-010-0024-4
12. Terenina N. B., Kreshchenko N. D., Mochalova N. V., Nefedova D. V., Voropaeva E. L., Movsesyan S. O., Demiaszkiewicz A., Yashin V. A. and Kuchin A. V. The new data on the serotonin and FMRFamide localization in the nervous system of *Opisthorchis felineus* metacercariae. *Acta Parasitologica*, **65**, 361–374 (2020). DOI: 10.2478/s11686-019-00165-2
13. Petrov A. and Podvyaznaya I. Muscle architecture during the course of development of *Diplostomum pseudospathaceum* Niewiadomska, 1984 (Trematoda, Diplostomidae) from cercariae to metacercariae. *J. Helminthology*, **90** (3), 321–336 (2016). DOI: 10.1017/S0022149X15000310
14. Крупенко Д. Ю. Пространственная организация мускулатуры церкарий *Himasthla elongata* (Trematoda: Echinostomatidae). *Паразитология*, **45** (6), 449–460 (2011).
15. Krupenko D. Y. Muscle system of *Diplodiscus subclavatus* (Trematoda: Paramphistomida) cercariae, pre-ovigerous and ovigerous adults. *Parasitol. Res.*, **113** (3), 941–952 (2014). DOI: 10.1007/s00436-013-3726-3
16. Salvador-Recatalà V. and Greenberg R. M. Calcium channels of schistosomes: unresolved questions and unexpected answers, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, **1** (1), 85–93 (2012). DOI: 10.1002/wmts.19
17. Graham M. K., McGeown J. G., and Fairweather I. Ionic mechanisms underlying spontaneous muscle contractions in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Am. J. Physiol.*, **277**, R374–R383 (1999). DOI: 10.1152/ajpregu.1999.277.2.R374
18. Hrckova G., Velenbny S., Halton D. W., and Maule A. G. *Mesocestoides corti* (syn. *M. vogae*): modulation of larval motility by neuropeptides, serotonin and acetylcholine, *Parasitology*, **124**, 409–421 (2002). DOI: 10.1017/s0031182001001329
19. Novozhilova E., Kimber M. J., Qian H., McVeigh P., Robertson A. P., Zamanian M., Maule A. G., Day T. A. FMRFamide-like peptides (FLPs) enhance voltage-gated calcium currents to elicit muscle contraction in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **4** (8), e790 (2010). DOI: 10.1371/journal.pntd.0000790
20. Wang W., Wang L., and Liang Y. S. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitol. Res.*, **111**, 1871–1877 (2012). DOI: 10.1007/s00436-012-3151-z
21. Greenberg R., Ca^{2+} signalling, voltage-gated Ca^{2+} channels and praziquantel in flatworm neuromusculature. *Parasitology*, **S131** (1), 97–108 (2005). DOI: 10.1017/S0031182005008346
22. Fairweather I., Brennan G. P., Hanna R. E. B., Robinson M. W., and Skuce P. J. Drug resistance in liver flukes. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug. Resist.*, **12**, 39–59 (2020). DOI: 10.1016/j.ijpddr.2019.11.003
23. Kreshchenko N. D. and Maule A. G., Investigation of peptide-induced and spontaneous and muscle activity in parasitic worm, a liver fluke, *Fasciola hepatica*. In *Proc. Int. Symp. “Biological Motility: Basic Research and Practice”* (Pushchino, 2006), pp. 28–29.
24. Fellowes R. A., Maule A. G., Marks N. J., Geary T. G., Thompson D. P. and Halton D. W., Modulation of the motility of the vagina vera of *Ascaris suum* in vitro by FMRFamide-related peptides. *Parasitology*, **116**, 277–287 (1998).
25. Mousley A., Marks N. J., Halton D. W., Geary T. G., Thompson D. P., and Maule A. G. Arthropod FMRFamide-related peptide modulated muscle activity in helminths. *Int. J. Parasitol.*, **34**, 755–768 (2004).
26. Wieland T. Modification of actins by phallotoxins. *Naturwiss.*, **64**, 303–309 (1977). DOI: 10.1007/BF00446784
27. Pollard T. D. and Weihing R. R., Actin and myosin and cell movement. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **2** (1), 1–65 (1974). DOI: 10.3109/10409237409105443.
28. Matthews J. B., Tally K. J., Smith J. A., and Awtrey C. S., F-actin differentially alters epithelial transport and barrier function. *J. Surg. Res.*, **56**, 505–509 (1994). DOI: 10.1006/jsre.1994.1081
29. Chazotte B. Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **5**, pdb.prot4947 (2010). DOI: 10.1101/pdb.prot4947
30. Rieger R., Salvenmoser W., Legniti A., Reindl S., Adam H., Simonsberger P., and Tyler S., Organization and differentiation of the body-wall musculature in *Macrostomum* (Turbellaria, Macrostomidae). *Hydrobiologia*, **227**, 119–129 (1991). DOI: 10.1007/BF00027591
31. Wahlberg M. H. The distribution of F-actin during the development of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Cell Tiss. Res.*, **291** (3), 561–570 (1998). DOI: 10.1007/s004410051025
32. Stitt A. W., Fairweather I., Trudgett A. G., Johnston C. F., and Anderson S. M. L. Localisation of actin in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.*, **78**, 96–102 (1992).
33. Mair G. R., Maule A. G., Shaw C., Johnston C. F. and Halton D. W. Gross anatomy of the muscle systems of *Fasciola hepatica* as visualized by phalloidin-fluores-

- cence and confocal microscopy. *Parasitology*, **117**, 75–82 (1998).
34. Stewart M. T., Marks N. J., and Halton D. W., Neuroactive substances and associated major muscle systems in *Bucephaloïdes gracilescens* (Trematoda: Digenea) metacercaria and adult. *Parasitol. Res.*, **91** (1), 12–21 (2003).
35. Kumar D., McGeown J. G., Reynoso-Ducoing O., Ambrosio J. R., and Fairweather I., Observations on the musculature and isolated muscle fibres of the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **127**, 457–473 (2003). DOI: 10.1017/s0031182003003925
36. Maule A. G., Shaw C., Halton D. W., and Tim L., GNFFRFamide: a novel FMRFamide-immunoreactive peptide isolated from the sheep tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **193** (3), 1054–1060 (1993).
37. Maule A. G., Shaw C., Halton D. W., Curry W. J., and Thim L. RYIRFamide: a turbellarian FMRFamide-related peptide (FaRP). *Regul. Pept.*, **50**, 37–43 (1994).
38. Johnston R. N., Shaw C., Halton D. W., Verhaert P., and Baguna J., GYIRFamide: a novel FMRFamide-related peptide (FaRP) from the triclad turbellarian, *Dugesia tigrina*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **209** (2), 689–697 (1995).
39. Johnston R. N., Shaw C., Halton D. W., Verhaert P., Blair K. L., Brennan G. P., Price D. A. and Anderson P. Isolation, localization, and bio-activity of the FMRFamide-related neuropeptides GYIRFamide and YIRFamide from marine turbellarian *Bdelloura candida*. *J. Neurochem.*, **67**, 814–821 (1996).
40. Крещенко Н. Д. Пептидергическая сигнализация: иммуноцитохимическое определение FMRF-подобных пептидов в нервной системе планарий. *Биол. мембранны*, **30** (5–6), 430–437 (2013). DOI: 10.7868/S0233475513050095
41. Magee R. M., Fairweather I., Johnston C. F., Halton D. W. and Shaw C. Immunocytochemical demonstration of neuropeptides in the nervous system of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea). *Parasitology*, **98** (2), 227–238 (1989). DOI: 10.1017/s0031182000062132
42. Marks N. J., Halton D. W., Maule A. G. Brennan G. P., Shaw C., Southgate V. R. and Johnston C. F. Comparative analyses of the neuropeptide F (NPF)- and FMRFamide-related peptide (FaRP)-immunoreactivities in *Fasciola hepatica* and *Schistosoma* spp. *Parasitology*, **110** (4), 371–381 (1995).
43. Brownlee D. J., Brennan G. P., Halton D. W., Fairweather I., and Shaw C. Ultrastructural localisation of FMRFamide- and pancreatic polypeptide-immunoreactivities within the central nervous system of the liver fluke, *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea). *Parasitol. Res.*, **80** (2), 117–124 (1994). DOI: 10.1007/BF00933778
44. Terenina N. B., Kreshchenko N. D., Mochalova N. V., and Movsesyan S. O., Serotonin and neuropeptide FMRFamide in the attachment organs of trematodes. *Helminthologia*, **55** (3), 185–194 (2018).
45. Day T. A., Maule A. G., Shaw C., Halton D. W., Moore S., Bennet J. L. and Pax R. A., Platyhelminth FMRFamide-related peptides (FaRPs) contract *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Digenea) muscle fibres *in vitro*. *Parasitology*, **109**, 455–459 (1994).
46. Hrchkova G., Velebny S., Halton D. W., Day T. A., and Maule A. G. Pharmacological characterization of neuropeptide F (NPF)-induced effects on the motility of *Mesocestoides corti* (syn. *Mesocestoides vogae*) larvae. *Int. J. Parasitol.*, **34**, 83–93 (2004).
47. Moneypenny C. G., Maule A. G., Shaw C., Day T. A., Pax R. A., and Halton D. W. Physiological effects of platyhelminth FMRFamide-related peptides (FaRPs) on the motility of the monogenean *Diclidophora merlangi*. *Parasitology*, **115** (3), 281–288 (1997). DOI: 10.1017/s0031182097001364
48. Marks N. J., Johnston C. F., Maule A. G., Halton D. W., Shaw C., Geary T. G., Moore S., and Thompson D. P. Physiological effects of platyhelminthes RFamide peptides on muscle-strip preparations of *Fasciola hepatica* (Trematoda: Digenea). *Parasitology*, **113**, 393–401 (1996).
49. Graham M. K., Fairweather I. and McGeown J. G. Second messengers mediating mechanical responses to the FARP GYIRFamide in the fluke *Fasciola hepatica*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **279** (6), R2089–2094 (2000)
50. Marks N. J., Maule A. G., Halton D. W., Geary T. G., and Shaw C., Pharmacological effects of nematode FMRFamide-related peptides (FaRPs) on muscle contractility of the trematode, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, **114**, 531–539 (1997).
51. Blair K. L., Day T. A., Lewis M. C., Bennet J. L., and Pax R. A. Studies on muscle cells isolated from *Schistosoma mansoni*. A Ca^{2+} -dependent K^+ channel. *Parasitology*, **102**, 251–258 (1991).
52. Day T. A., Maule A. G., Shaw C., and Pax R. A. Structure-activity relationships of FMRFamide-related peptides contracting *Schistosoma mansoni* muscle. *Peptides*, **18** (7), 917–921 (1997).
53. Novozhilova E., Kimber M. J., Qian H., McVeigh P., Robertson A. P., Zamanian M., Maule A. G., and Day T. A. FMRFamide-like peptides (FLPs) enhance voltage-gated calcium currents to elicit muscle contraction in the human parasite *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **4** (8), e790 (2010). DOI: 10.1371/journal.pntd.000079
54. Blair K. L. and Anderson P. A. Physiological and pharmacological properties of muscle cells isolated from the flatworm *Bdelloura candida* (Tricladia). *Parasitology*, **109**, 325–335 (1994).
55. Moneypenny C. G., Kreshchenko N., Moffett C. L., Halton D. W., Day T. A., and Maule A. G., Physiological effects of FMRFamide-related peptides and classical transmitters on dispersed muscle fibres of the turbellarian, *Procerodes littoralis*. *Parasitology*, **122** (4), 447–455 (2001). DOI: 10.1017/s0031182001007508.

Morphological and Functional Characteristics of the Trematode *Fasciola hepatica* Musculature

N.D. Kreshchenko*

*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The morphological structure and functional properties of musculature of flatworms *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae), parasites dangerous for agricultural animals and humans, have been studied. The histochemical staining of the body wall muscles of *F. hepatica* with fluorescently-labelled phalloidin has been performed and the stained samples were examined by fluorescent microscopy. Staining was observed both in longitudinal, circular, and diagonal muscle fibers of the body wall of the trematode, in the circular and diagonal muscle fibers surrounding the lumens of the branched intestine, and in the tubular structures of the reproductive tract. In the ventral and oral suckers of the trematode, tightly packed and intensively stained layers of muscle fibers were found. The physiological studies were conducted on the muscle strips prepared from *F. hepatica*. The results demonstrated that muscle preparations exhibit spontaneous contractile activity. Neuropeptide GYIRF, belonging to the FMRFamide-like peptide family, used at concentrations ranging from 1 μ m to 10 μ m, additionally stimulated the contractions of muscle preparations in *F. hepatica*, increasing the frequency and amplitude of contractions compared to their basic activity. The information obtained will be used in further investigation of muscle contraction mechanism in parasitic worms, the muscles of which are targets of antiparasitic drugs.

Keywords: fluorescent microscopy, histochemistry, muscles, parasitic flatworms, FMRFamide-like peptides