

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК
(ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН»)

На правах рукописи

Сидор Евгения Александровна

**КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОГЕНА
В КАЧЕСТВЕ ПОКАЗАТЕЛЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА
У ГЕЛЬМИНТОВ**

1.5.17. Паразитология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук
О.Н. Андреев

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
2.1. Роль гликогена в энергетическом метаболизме гельминтов. Накопление и мобилизация гликогена, основные способы регуляции.....	11
2.2. Депонирование и содержание гликогена у трихинелл.....	22
2.3. Энергетический метаболизм у фасциол.....	27
2.4. Методические проблемы определения содержания гликогена в гельминтах	33
3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
3.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ	52
3.2.1. Отработка и адаптация спектрофотометрического метода определения концентрации гликогена в гельминтах на культуре модельной нематоды <i>C. elegans</i>	52
3.2.2. Изучение влияния хлорида аммония на оптическую плотность анализируемых растворов при различных температурах	55
3.2.3. Определение необходимого количества биомассы трихинелл в границах чувствительности спектрофотометрического метода	58
3.2.4. Динамика изменения концентрации гликогена в личинках <i>T. spiralis</i> на мышечной стадии развития.....	59
3.2.5. Содержание гликогена в трихинеллах в течение первых суток после заражения лабораторных животных	61
3.2.6. Динамика содержания гликогена, жизнеспособность и инвазионность личинок трихинелл <i>T. nativa</i> и <i>T. pseudospiralis</i> в естественных условиях в зимне-весенний период в Центральном регионе России	62
3.2.7. Влияние повышенной температуры на содержание гликогена и жизнеспособность личинок трихинелл.....	67

3.2.8. Динамика содержания гликогена, инвазионности и жизнеспособности адолескариев <i>F. hepatica</i> при различных температурах.....	68
3.2.9. Отработка спектрофотометрического метода определения концентрации гликогена в фасциолах. Сравнение содержания гликогена в свежесыделенном и подвергнутому недолговременной заморозке материалу	71
3.2.10. Определение содержания гликогена в трематодах <i>F. hepatica</i> на преимагинальной стадии развития после однократного введения крысам антигельминтиков из группы бензимидазолов	74
3.2.11. Определение содержания гликогена в имагинальных фасциолах после многократного введения крысам препаратов, производных бензимидазолов	77
3.3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	80
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	94
5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	96
6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	98
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	99
8. ПРИЛОЖЕНИЕ.....	128

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Гликоген представляет собой резервный полисахарид, построенный из остатков глюкозы. Одним из ключевых путей ее метаболизма является образование энергетического соединения – аденозинтрифосфата. Данный ресурс необходим для всех энергозависимых процессов в организме: обеспечивает рост, деление, сократительную и функциональную активность клеток. Гликоген является основным резервным субстратом для синтеза энергетических соединений в условиях недостатка кислорода, где использование липидов в качестве источника энергии ограничено. Несмотря на наличие многочисленных путей катаболизма у гельминтов, анаэробный гликолиз является малоэффективным способом получения энергии, так как количество образованного аденозинтрифосфата на молекулу расщепленной глюкозы относительно невелико. Это объясняет значительный расход гликогена при недостатке экзогенных питательных веществ и высокую зависимость гельминтов от достаточного содержания данного соединения для реализации биологического цикла и адаптации к неблагоприятным условиям среды. Изучением данных вопросов, применяя качественные методы определения гликогена, занимались многие исследователи, такие как Гинецинская Т.А. [31, 32, 33], Гридасова Л.Ф. [36], Переверзева Э.В. [60, 62], Яворский И.П. [86], Бибик О.И. [12, 17], Начева Л.В. [56], von Brand T. [252], Kozar Z. [161], Wu Z. [257] и др.

Гельминты, использующие преимущественно анаэробный тип метаболизма на той или иной стадии развития, при условии доступности субстратов накапливают значительные количества гликогена, что позволяет определять его содержание количественными методами в относительно малом объеме биоматериала и регистрировать достоверные изменения концентрации в большем диапазоне значений. Данные свойства открывают для исследователей возможность применения количественных методов определения гликогена для решения различных задач в области паразитологии, связанных с изучением динамики накопления и расходования данного полисахарида.

В направлении разработки количественных методов описаны различные подходы определения гликогена в гельминтах [121, 130, 231, 239, 253], тем не менее, они обладают рядом недостатков. Среди количественных методов наиболее предпочтительными являются специфические спектрофотометрические методы, поскольку они обладают достаточными чувствительностью и точностью, не требуют использования дорогостоящей аппаратуры и обеспечивают получение объективных, достоверных, доступных для анализа и интерпретации результатов. Вопросы применения таких методов в практике гельминтологических исследований не нашли своего всеобъемлющего решения и в настоящее время продолжают оставаться актуальными. Следует полагать, что дальнейшая разработка и усовершенствование количественного метода определения гликогена является исследованием в актуальном научном направлении и решает задачу, имеющую важное научное значение.

Степень разработанности темы исследования. В области паразитологии представлены количественные методы определения содержания гликогена по Montgomery R. [190], Seifter S. [222], Pfleiderer G. [201] и др. Данные методы основаны на гидролизе сахаров и измерении с использованием различных реактивов концентрации свободной глюкозы в анализируемых пробах. Поскольку полученные результаты отражают суммарное содержание углеводов, включая свободную глюкозу и другие сахара, то такие методы нельзя назвать специфичными.

Анализ имеющихся сведений о методах, применяемых в иных областях исследований, позволил выявить прямой специфичный спектрофотометрический способ определения концентрации непосредственно гликогена без разрушения структуры [192]. По мнению разработчика, высокая зависимость результатов от температуры и концентрации йода в исследуемых растворах требовала усовершенствования и оптимизации условий проведения анализа. Результатом явилось то, что метод не нашел в свое время достаточного применения.

Позже описанный метод был в некоторой мере доработан Krisman C.R. [165]. Автор предложила использовать насыщенные растворы хлорида кальция и

хлорида аммония для повышения чувствительности анализа и определила оптимальную для проведения исследования концентрацию реагентов.

Данченко Е.О. и Чиркин А.А. [37] апробировали и адаптировали предложенный Krisman C.R. [165] метод для применения в области судебно-медицинской экспертизы.

Возможность использования данного специфического спектрофотометрического метода, простого технологически и требующего незначительных затрат времени (2,5-4 ч), для определения содержания гликогена в гельминтах представляет интерес для решения не только научных, но и практических задач.

Цель исследования. Цель настоящей работы заключалась в усовершенствовании методики количественного определения содержания гликогена в гельминтах и ее приложении к решению вопросов, связанных с жизненным циклом возбудителей и их сохраняемости при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды.

Задачи исследования:

- адаптировать известную методику определения концентрации гликогена в тканях макроорганизмов к объекту исследования «гельминты» на примере свободноживущей модельной нематоды *Caenorhabditis elegans*;
- определить изменения в содержании гликогена в процессе биологического цикла развития *Trichinella spiralis*;
- исследовать динамику содержания гликогена и некоторые биологические свойства в личинках *T. nativa* и *T. pseudospiralis* на мышечной стадии развития при хранении биоматериала (тушек инвазированных крыс) в зимне-весенний период в естественных условиях среды Центрального региона России;
- изучить влияние различных температур на содержание гликогена, жизнеспособность и инвазионность адолескариев *Fasciola hepatica*;
- проанализировать содержание гликогена в фасциолах *F. hepatica* на преимагинальной стадии развития после терапии крыс антигельминтиками из группы бензимидазолов при однократном введении препаратов;

- оценить изменения в концентрации гликогена в имагинальных *F. hepatica* у крыс после терапии препаратами, производными бензимидазолов, при многократном введении.

Научная новизна. Усовершенствована методика количественного определения содержания гликогена в гельминтах.

Получены новые данные о концентрации гликогена в процессе биологического цикла развития *T. spiralis*. Исследована динамика содержания гликогена, жизнеспособность и инвазионность в мышечных личинках *T. nativa* и *T. pseudospiralis* при хранении в естественных условиях среды в зимне-весенний период в тушках инвазированных крыс. Показано, что данные биологические свойства напрямую зависят от содержания резервного полисахарида: при низком уровне гликогена жизнеспособные личинки утрачивают свои инвазионные свойства.

Изучено изменение показателей содержания гликогена, жизнеспособности и инвазионности адолескариев *F. hepatica* при воздействии различных температур.

Определено изменение концентрации гликогена в трематодах *F. hepatica* на преимагинальной и имагинальной стадии развития при терапии хозяина препаратами, производными бензимидазолов, с использованием различных схем лечения.

Научная новизна исследований подтверждена патентом № 2681167 на изобретение «Способ определения количества гликогена в личинках трихинелл для контроля качества обезвреживания инвазионного материала» бюл. № 7 от 04.03.2019 г.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость настоящей работы заключается в том, что результаты, полученные с помощью описанного метода, позволяют оценить соотношение процессов синтеза и распада энергетического резервного субстрата гельминтов – гликогена, и тем самым дополнить имеющиеся знания об особенностях энергетического метаболизма гельминтов, обеспечивающего их жизнедеятельность и выживание.

С практической стороны является перспективным использование метода при изучении биологических основ профилактики гельминтозоозов животных и человека и тестирования средств и методов обезвреживания зараженного материала, поскольку анализируемый полисахарид может рассматриваться в качестве дополнительного и информативного критерия при оценке инвазионности. Определение концентрации гликогена позволяет исследовать влияние определенных факторов внешней среды в контролируемых условиях на выживаемость культуры гельминтов.

Данные, полученные при изучении содержания гликогена в личинках трихинелл, могут быть использованы при разработке профилактических мероприятий при трихинеллезе.

Исследования содержания гликогена позволяют изучить реактивность фасциол после воздействия препаратов из группы бензимидазолов и могут быть полезны при разработке новых схем и методов терапии и профилактики фасциолеза. Определение концентрации гликогена спектрофотометрическим методом позволяет повысить информативность оценки эффективности воздействия антигельминтиков на гельминтов и раскрыть некоторые аспекты механизма действия химиопрепаратов.

На основании результатов исследований разработаны и одобрены секцией «Инвазионные болезни» ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол №3 от 25.10.2019 г.) «Методические положения оценки инвазионной способности личинок гельминтозоозов по содержанию гликогена».

Методология и методы исследования. Методологическим подходом в достижении цели и решении поставленных задач явилось системное изучение объектов исследования, анализ, сравнение и обобщение литературных данных и полученных собственных результатов. Объектами исследования были выбраны представители класса нематод (*C. elegans*, *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. pseudospiralis*) и трематод (*F. hepatica*). Предметом исследования стало усовершенствование способа определения концентрации гликогена в гельминтах для последующего решения ряда задач в области паразитологии.

При выполнении диссертационной работы использовали микроскопические, микробиологические, паразитологические, патологоанатомические, физико-химические и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту:

1. Оптимизирована методика специфичного количественного спектрофотометрического определения содержания гликогена, адаптированная для применения в области гельминтологии на примере представителей классов нематода и трематода.

2. Инвазионность и жизнеспособность личинок трихинелл зависит от количественного содержания в них гликогена.

3. Динамика расходования гликогена адолескариями фасциол связана с температурой окружающей среды и коррелирует с изменением показателя жизнеспособности.

4. Контроль содержания гликогена в гельминтах может служить в качестве дополнительного критерия оценки эффективности антигельминтных препаратов.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов определяется использованием общепринятых методов исследований, достаточного объема выборки изучаемых объектов и соответствием контрольных значений, полученных в настоящей работе и представленных в литературных источниках. Достоверность результатов подтверждена статистической обработкой данных с использованием t-критерия Стьюдента.

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 научных статей, из которых 3 в изданиях, рецензируемых ВАК РФ, и 4 в журналах, включенных в базу данных Scopus, в которых изложены основные положения и выводы по изучаемым вопросам. Получен патент на изобретение.

Материалы диссертационной работы были доложены и представлены на международной научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» (Москва, 2019, 2020, 2021 г.) и на 15th International Conference on Trichinellosis (Румыния, 2019 г.).

Личный вклад автора. Представленная диссертационная работа является результатом четырехлетних научных исследований автора, проведенных в лаборатории паразитарных зоонозов «Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрябина» («ВНИИП») – филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и в его виварии с 2018 по 2021 г. Изучение сохраняемости личинок трихинелл в естественных условиях проводили на территории Шиловского охотхозяйства (РООиР) Рязанской области.

Автором лично проведены анализ литературных данных, культивирование нематоды *C. elegans*, пробоподготовка и спектрофотометрические исследования содержания гликогена, в том числе отработка метода на различных объектах и оптимизация условий проведения анализа, в части экспериментов – выделение и определение жизнеспособности гельминтов, постановка экспериментов по изучению влияния антигельминтиков на фасциол, анализ и статистическая обработка полученных данных. Статьи, которые были написаны в соавторстве, включают не менее 85% от общего количества всех материалов в исследовании аспиранта. Основная часть исследований выполнена автором лично, и соавторы не возражают в использовании результатов совместных исследований.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 129 страницах компьютерного набора текста, состоит из введения, обзора литературы, раздела собственных исследований, включающего материалы методы, результаты и обсуждение результатов, заключения, практических предложений, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Список литературы включает 262 наименования, в том числе 86 работ отечественных авторов и 176 – иностранных. Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 12 рисунками. Приложение к диссертации включает «Методические положения оценки инвазионной способности личинок гельминтозоонозов по содержанию гликогена», патент на изобретение № 2681167 «Способ определения количества гликогена в личинках трихинелл для контроля качества обезвреживания инвазионного материала».

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Роль гликогена в энергетическом метаболизме гельминтов. Накопление и мобилизация гликогена, основные способы регуляции

Основы энергетического метаболизма гельминтов

Энергетический метаболизм – процесс диссимиляции органических соединений, сопровождающийся выделением энергии, часть из которой запасается в форме аденозинтрифосфата (АТФ) и других молекул с высокоэнергетическими фосфатными группами. Данный ресурс необходим для всех энергозависимых процессов в организме; обеспечивает рост, деление, сократительную и функциональную активность клеток. Внутриклеточная концентрация АТФ весьма мала, изменчива и быстро истощаема. Постоянный приток АТФ поддерживается за счет расщепления энергетических субстратов. Энергетическая эффективность катаболизма определяется количеством синтезируемого АТФ [72].

Энергетический метаболизм гельминтов характеризуется наличием многочисленных ферментативных реакций, позволяющих обеспечить метаболическую гибкость и универсальность для успешного приспособления к условиям окружающей среды в процессе биологического цикла развития. Направления энергетического метаболизма во многом обусловлены доступностью кислорода и питательных субстратов, а также эволюционно сложившимися механизмами адаптации. Общая схема энергетического метаболизма у гельминтов представлена на рисунке 1.

В зависимости от доступности кислорода на некоторых стадиях цикла развития гельминтов может превалировать аэробный энергетический метаболизм, а на других – анаэробный [164].

В качестве энергетических субстратов в присутствии кислорода могут выступать вещества как углеводной, так и липидной природы (вклад белков в энергетический метаболизм гельминтов считается минимальным, что позволяет его не учитывать) [243].

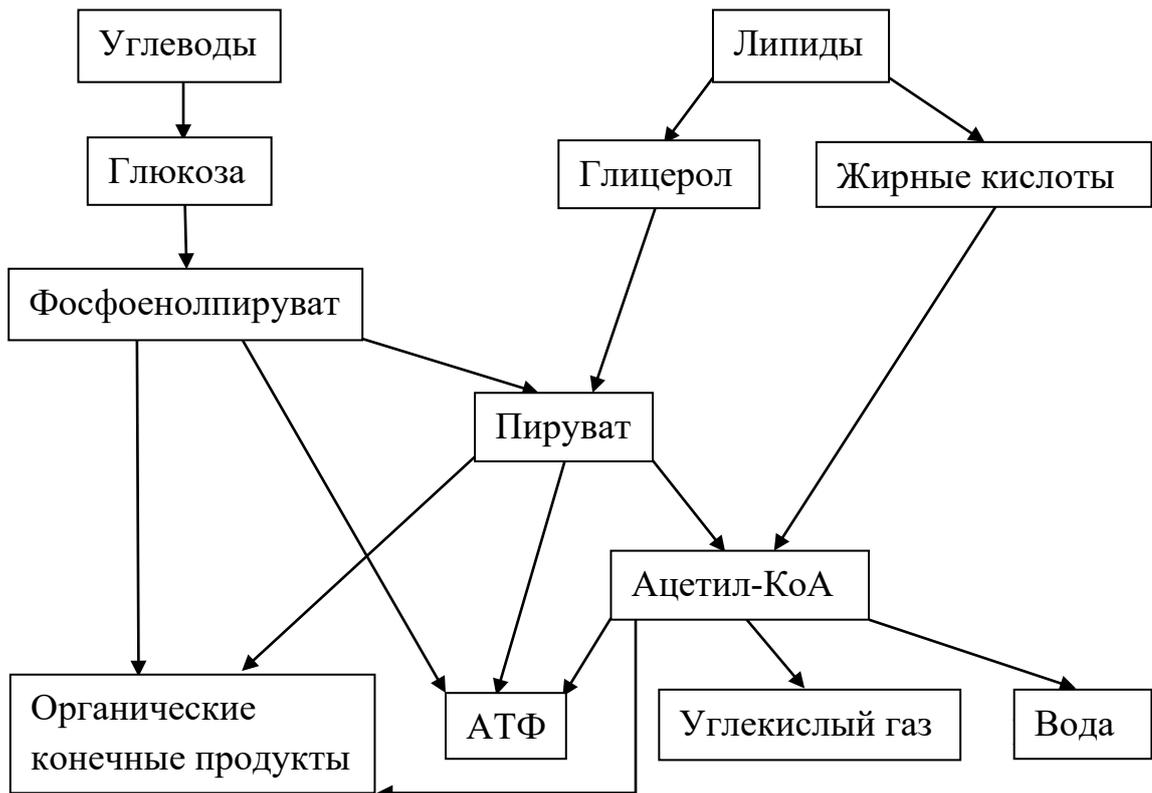


Рисунок 1 – Общая схема энергетического метаболизма у гельминтов

По заключению большинства специалистов, аэробный метаболизм гельминтов аналогичен таковому у млекопитающих. Углеводы подвергаются деградации гликолитическим путем до пирувата, который затем транспортируется из цитозоля в митохондрии, где превращается в ацетил-КоА. Данная молекула является также продуктом β -окисления жирных кислот. Катаболизм ацетил-КоА через цикл трикарбоновых кислот приводит к образованию углекислого газа и воды. В результате аэробного гликолиза синтезируется 38 молекул АТФ на молекулу расщепленной глюкозы, что позволяет гельминтам эффективно использовать имеющиеся энергетические резервные субстраты [108, 243].

Аэробный метаболизм характерен для свободноживущих стадий развития гельминтов. Такой же механизм задействуют некоторые личиночные стадии паразитов при развитии в кислородсодержащих средах, например, легочная аскарида (L3) [157], и паразиты крови, такие как нематода *Brugia pahangi* [214], трематода *Schistosoma mansoni* [221].

В бескислородных условиях использование липидов в качестве источника энергии невозможно. Анаэробный метаболизм гельминтов разветвлен, а конечные продукты представляют собой смесь таких органических веществ, как летучие кислоты, сукцинат, пропионат, ацетат, лактат, спирты и т.д., основным предшественником которых является малат. В данном случае углеводы разлагаются до фосфоенолпирувата, который затем карбоксилируется до оксалоацетата и восстанавливается до малата. Последний транспортируется из цитозоля в митохондрии для дальнейшего катаболизма [147, 160, 220, 243].

Анаэробный гликолиз, преобладающим конечным продуктом которого является лактат, представляет собой наименее энергетически выгодный путь метаболизма. В результате гомолактатной ферментации образуется только 2 молекулы АТФ на молекулу расщепленной глюкозы. Тем не менее, подобный тип метаболизма наблюдается у паразитирующих в кровеносных сосудах и подкожных тканях (в условиях высокой физиологической стабильности среды) гельминтов, в частности, *S. mansoni*. Предполагается, что гомолактатная ферментация присуща, в некоторой степени, всем гельминтам [220, 243].

Использование смешанных ферментаций энергетически более выгодно в сравнении с гомолактатной ферментацией: анаэробное разложение глюкозы до ацетата и пропионата сопровождается образованием более 5 моль АТФ на моль глюкозы [164].

Факторы, определяющие соотношение конечных продуктов, многочисленны и являются сложными. К ним необходимо отнести доступность кислорода и размер организма (как функция соотношения поверхности и объема), которые играют ключевую роль в выборе путей, используемых для производства энергии и поддержания окислительно-восстановительного равновесия. К тому же, константа диссоциации многих из перечисленных продуктов, таких как летучие кислоты, намного ниже, чем лактата, что может способствовать их выделению и минимизации влияния на окисление тканей [108, 160].

Энергетическая эффективность анаэробно функционирующих путей в несколько раз ниже по сравнению с получаемой при полном окислении

органических веществ до углекислого газа и воды. Тем не менее, половозрелые гельминты, заселяющие кислородсодержащие среды, никогда не используют исключительно аэробный метаболизм, а продолжают в разной степени пользоваться анаэробными путями [164]. Например, трематода *S. mansoni*, паразитирующая в крови, окисляет лишь небольшой процент утилизируемой ею глюкозы до CO_2 и H_2O , в то время как основным продуктом ее катаболизма является лактат [248]. Подобный тип метаболизма характерен и для других видов шистосом: *S. japonicum*, *S. haematobium*, *S. intercalatum*, *S. bovis* [240, 241]. Ramp T. и Köhler P. провели расчеты, которые показали, что даже относительно малая доля полностью окисленного субстрата может внести существенный вклад в общую энергетику гельминта [164, 213].

Причина возникновения у гельминтов ограниченной способности к окислению не полностью ясна. Можно предположить, что разнообразие альтернативных анаэробных путей развилось в ответ на отсутствие циркуляторной системы и/или специфические условия среды. Даже если кислород присутствует в среде обитания гельминта, его использование будет ограничиваться внешним поверхностным слоем тела паразита, поскольку дыхательная и кровеносная система отсутствуют [108].

Альтернативная гипотеза, которую высказал Barrett J. [96], заключается в том, что метаболизм гельминтов представляет собой форму биохимической экономии. Большинство эндопаразитов не испытывают недостатка питательных веществ и не имеют потребности извлекать максимальные количества химической энергии из питательных веществ, которые они поглощают. С другой стороны, тот факт, что свободноживущие и другие личиночные или ювенильные стадии развития гельминтов часто обладают типичным аэробным метаболизмом, ясно указывает на то, что дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) этих организмов несет генетическую информацию всех ферментов, участвующих в полном окислении субстрата. На поздних стадиях развития может быть выгоднее содержать эти гены инактивированными или репрессированными и использовать более простые метаболические схемы [96, 164].

Такая биологическая стратегия, опирающаяся на использование малоэффективных с точки зрения энергетики путей метаболизма, может успешно реализовываться только в условиях обилия субстратов для синтеза энергии. В их роли служат наиболее окисленные органические соединения – углеводы [243].

Основным метаболитом и транспортной формой углеводов является глюкоза, которая запасается в клетках в виде гликогена. Метаболизм глюкозы посредством образования и расщепления гликогена помогает поддерживать низкую концентрацию внутренней свободной глюкозы и также способствовать поступлению достаточного количества глюкозы в более глубокие ткани посредством диффузии [160].

Гликоген является основным резервным полисахаридом гельминтов, достигающим в некоторых случаях 50% и более от сухой массы организма [135, 225]. Для сравнения, содержание его в свободноживущих нематодах *Caenorhabditis* sp. составляет только около 3% (от сухой массы) [118].

Накопление гликогена гельминтами в столь значимых количествах обусловлено его исключительной важностью в качестве запасного источника энергии.

Репарация и адаптация гельминтов к стресс-факторам в энергетическом аспекте

Избыточные запасы углеводов и других метаболитов обеспечивают выживание гельминтов в неблагоприятных условиях среды и гарантируют осуществление репарации и адаптации организма при воздействии стресс-факторов.

Репарация – процесс восстановления повреждений клеток организма, обуславливающий их структурную и функциональную целостность. Благодаря этому свойству обеспечивается жизнедеятельность всего организма. Способность клетки поддерживать упорядоченное состояние в течение длительного времени происходит благодаря непрерывному потреблению энергии [41].

Репарация имеет определяющее значение для сохранения жизнеспособности под воздействием различных экстремальных факторов. Одним из условий элиминации функционально-биохимических нарушений в клетке и успешной репарации повреждений является повышенный приток энергии, поддерживающий концентрацию АТФ на необходимом уровне. Этот процесс может осуществляться гельминтами длительное время за счет вовлечения избыточных резервов гликогена. В случае прекращения поступления энергии репарация останавливается. Стоит отметить, что критические повреждения приводят гельминта к гибели раньше, чем репарационные возможности будут задействованы или исчерпают свой ресурс [99].

Репарация физиологических и биохимических процессов, невозможная без энергетических затрат, и адаптивные свойства организмов в целом обеспечивают реализацию стратегии вида – его сохранение, расширение ареала либо удержание занимаемой им экологической ниши.

Строение молекулы гликогена

По физическим и химическим свойствам гликоген гельминтов схож с гликогеном позвоночных [20, 42]. Молекула гликогена имеет разветвленную структуру, в которой остатки глюкозы соединены α -1,4-гликозидными связями; в точках ветвления – α -1,6-гликозидными связями. Особенности структуры позволяют запасать максимальное количество глюкозы в минимально возможном объеме [215].

В молекуле гликогена различают внутренние цепи — участки полигликозидных цепей между точками ветвления и наружные цепи — участки от периферической точки ветвления до нередуцирующего конца цепи. Длина наружных и внутренних цепей в молекулах гликогена варьирует в зависимости от вида животного и органа, из которого он выделен.

Согласно современным представлениям, полностью сформированная молекула гликогена, называемая также β -частицей, имеет диаметр 10-50 нм и содержит около 55000 остатков глюкозы. β -частица, в центре которой находится

самогликозилирующийся белок гликогенин, состоит из 12 концентрических ярусов. Четыре внешних яруса частицы включают ~ 94-97% всех глюкозных остатков, а восемь внутренних ярусов образуют прогликоген [87, 176, 183, 184, 224]. В состав β -частиц входят некоторые ферменты метаболизма гликогена, образуя динамичный углеводно-белковый комплекс [102, 186, 204, 230]. Разветвленная структура гликогена способствует работе ферментов, отщепляющих или присоединяющих мономеры [215]. Показано, что в гликогене содержится 50-70% гликогенфосфорилазы и 70-90% гликогенсинтазы от общего количества этих ферментов в клетке [71]. В клетках организмов помимо β -частиц гликоген может находиться также в виде α -частиц (с диаметром до 200 нм и более), которые представляют собой ковалентно связанные комплексы, состоящие из 20-40 β -частиц [129, 218, 234, 261].

По данным Безбородкиной Н.Н. [8] максимальное время образования одной гликозидной связи в молекуле гликогена составляет около 10 мс, а β -частица гликогена образуется примерно за 8 мин.

В силу своей высокой лабильности, способности, в отличие от жира, быстро откладываться в клетках и с высокой скоростью расщепляться до глюкозы, гликоген играет чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности организмов.

Синтез и распад гликогена. Основные способы регуляции метаболизма

Синтез гликогена из глюкозы, как и всякий анаболический процесс, является эндотермическим, т.е. требующим затрат энергии. Началом метаболических событий, ведущих к синтезу гликогена, является превращение глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф), образующегося при фосфорилировании глюкозы с участием АТФ, в глюкозо-1-фосфат (Г-1-Ф). Далее Г-1-Ф соединяется с уридинтрифосфатом с образованием уридиндифосфатглюкозы (УДФ-глюкозы). Собственно синтез гликогена начинается с переноса остатка глюкозы в УДФ-глюкозе на самогликозилирующийся белок-затравку гликогенин. Он переносит остатки глюкозы с УДФ-глюкозы сначала на остаток тирозина внутри самого

белка, а затем образует α -1,4-гликозидные связи до тех пор, пока олигосахаридная цепь не достигнет длины в 10-20 остатков [72, 87, 175, 216, 228].

Дальнейшее формирование молекулы гликогена происходит с участием гликогенсинтазы, ветвящего энзима и других ферментов лишь после того, как закончится самогликозилирование гликогенина. Предполагается, что гликоген в клетках до конца никогда не расщепляется. Поэтому его синтез с помощью гликогенсинтазы и других ферментов может начаться сразу с переноса остатков глюкозы с УДФ-глюкозы на гликозилированный гликогенин.

Распад гликогена может осуществляться как гидролитическим путем, так и путем фосфоролиза. Наиболее важным ферментом для расщепления гликогена путем фосфоролиза является гликогенфосфорилаза, отсоединяющая от невозстанавливающего конца цепи остатки глюкозы в виде Г-1-Ф. Гликогенфосфорилаза расщепляет только α -1,4-гликозидные связи. Последовательное отщепление глюкозных остатков прекращается, когда до точки ветвления остается 4 мономера. Три оставшихся до точки ветвления глюкозных остатка переносятся при участии олигосахаридтрансферазы на нередуцирующий конец соседней цепи, удлиняя ее и, таким образом, создавая условия для действия гликогенфосфорилазы. Оставшийся в точке ветвления глюкозный остаток гидролитически отщепляется с помощью α -1,6-глюкозидазы в виде свободной глюкозы, после чего неразветвленная цепь, может вновь расщепляться фосфорилазой. Г-1-Ф затем изомеризуется фосфоглюкомутазой в Г-6-Ф и включается в процесс катаболизма или другие метаболические пути. Образование Г-1-Ф вместо глюкозы обладает преимуществом, поскольку для включения освобожденных остатков глюкозы в гликолиз не требуется АТФ [7, 72, 160].

Метаболизм гликогена отличается необычайной сложностью, а его регуляция осуществляется с помощью механизмов, включающих различные ферменты, гормоны, ингибиторы и активаторы ферментов, а также ионы металлов [137, 141, 150].

Одним из основных принципов этих механизмов является существование двух форм важнейших ферментов метаболизма гликогена —

гликогенфосфорилазы и гликогенсинтетазы – активной и неактивной. При фосфорилировании гликогенсинтаза инактивируется и активируется гликогенфосфорилаза, при дефосфорилировании – наоборот. Аллостерическая регуляция происходит за счет продуктов углеводного энергетического обмена. Активность гликогенфосфорилазы уменьшается при избыточной концентрации в клетке Г-6-Ф и АТФ и увеличивается при повышенном содержании аденозинмонофосфата (АМФ). На активность гликогенсинтазы влияет аллостерический активатор Г-6-Ф. В фосфорилированной форме данные ферменты не меняют конформацию под действием аллостерических эффекторов [72].

Известны некоторые аспекты гормональной регуляции метаболизма гликогена у гельминтов. На примере *F. hepatica* показано, что адреналин и инсулин не оказывают значительного влияния на углеводный метаболизм трематоды, в отличие от млекопитающих. В фасциолах присутствует серотонин [178], который повышает активность гликогенфосфорилазы, фосфофруктокиназы и стимулирует выработку циклического АМФ [179, 182, 233], что приводит к увеличению поглощения и расщепления глюкозы, мобилизации гликогена и преумножению производства лактата в 2-10 раз [181].

Таким образом, направление метаболизма гликогена зависит от соотношения концентраций ключевых метаболитов, ферментов и гормонов. Распад гликогена происходит в ответ на повышение потребности клетки в глюкозе и/или АТФ.

Особенности накопления гликогена у гельминтов

Гликоген присутствует у всех гельминтов, но его относительное количество значительно варьирует от вида к виду и изменяется при переходе от ранних стадий развития к более поздним [160].

Гельминты эволюционно приспособлены к обитанию в относительно стабильной среде, сформированной за счет способности хозяина поддерживать гомеостаз. Большая часть энергии расходуется на биосинтез, поддержание

градиентов и других процессов жизнедеятельности, особенно во время быстрого роста на отдельных этапах развития и в период яйцепродукции [23, 25]. Наибольшее содержание гликогена отмечается в репродуктивной, мышечной тканях, а также вблизи органов, отвечающих за всасывание питательных веществ. У цестод и трематод основным местом отложения гликогена служит паренхима, притом чаще всего участки, окружающие физиологически активные органы [32, 48, 53, 55].

Содержание гликогена в органах репродуктивной системы обусловлено особенностями биологии размножения данного вида. Согласно Гинецинской Т.А. и др. [31, 32], у гельминтов, развитие яиц которых осуществляется во внешней среде, в желточниках откладывается большое количество запасных питательных веществ, а желточные железы интенсивно развиты. В цитоплазме желточных клеток, помимо скорлуповых гранул, содержится гликоген и липиды. Эти запасы – единственный источник энергии во время развития зародыша.

У видов, для которых характерно развитие яиц в матке, желточники, как правило, лишены запасов питательных веществ и претерпевают редукцию. В цитоплазме желточных клеток содержатся только скорлуповые гранулы, которые требуются для построения оболочки яйца. У таких гельминтов источником энергии, необходимой для развития зародыша, служат запасы гликогена, сосредоточенного в паренхиме, главным образом в зоне непосредственного прилегания к матке. Гликоген паренхимы гидролизуется до глюкозы, которая транспортируется в полость матки и затем внутрь яйца. Глюкоза потребляется в процессе развития зародыша, а на последних стадиях эмбриогенеза частично ресинтезируется в гликоген.

Жизнеспособность гельминтов на свободноживущих непитающихся стадиях развития полностью зависит от эндогенных энергетических запасов. Если эти резервы будут исчерпаны прежде, чем организм перейдет на следующий этап биологического цикла, то гельминт погибает.

Вектор накопления/мобилизации гликогена зависит от доступности питательных веществ в окружающей гельминта среде и от интенсивности

пластического и энергетического метаболизма. Так, содержание гликогена у кишечных гельминтов в абсорбтивный период повышается, а в постабсорбтивный снижается, особенно при голодании хозяина [142]. Напротив, паразиты крови, такие как шистосомы, постоянно пребывают в среде, богатой глюкозой, и уровень гликогена у них сильно не изменяется [160].

Интересным в данном отношении примером является распределение глюкозы и гликогена в стробиле цестод. Проведенные Извековой Г.И. [44, 45] исследования показали, что содержание глюкозы в стробиле *Triaenophorus nodulosus* понижается от переднего отдела к заднему, а гликогена, наоборот, повышается. При определении абсорбции глюкозы у *T. nodulosus* наибольшая интенсивность аккумуляции обнаружена в 1-м отделе, содержащем сколекс и шейку ($7,63 \pm 1,08$ ммоль), где отмечено ее противогradientное, т.е. энергозависимое, накопление. В следующих отделах наблюдается достоверное снижение этого показателя до $3,27 \pm 1,27$ ммоль. Уменьшение содержания глюкозы от переднего отдела к заднему продемонстрировано и у таких цестод, как *Eubothrium rugosum* и *Hymenolepis diminuta* [43, 119, 123]. Установлено, что количество гликогена вдоль стробилы гельминта *T. nodulosus* достоверно увеличивается от 1-го до 8-го отдела: с $0,055 \pm 0,015$ мг/мг в 1-м отделе до $0,110 \pm 0,001$ мг/мг — в 8-ом [45]. Другие авторы также показали, что у исследованных ими видов цестод содержание гликогена выше в зрелых проглоттидах, чем в незрелых и gravidных [142, 237, 250]. Увеличение содержания запасного углевода вдоль стробилы цестод и одновременное понижение содержания глюкозы в тканях может свидетельствовать о включении глюкозы в процессы синтеза, связанные с формированием гонад [45].

Поскольку гельминты обладают широким спектром механизмов адаптации и путей обмена, каждый вид паразита, несмотря на некоторые указанные общие закономерности метаболизма гликогена, должен быть исследован как уникальный случай. Далее будут подробно описаны процессы накопления и расходования гликогена в течение биологического цикла развития нематоды *Trichinella spiralis* и трематоды *Fasciola hepatica*.

2.2. Депонирование и содержание гликогена у трихинелл

Стихозома – депо гликогена у трихинелл

Результаты прикладных исследований свидетельствуют о неравномерном распределении гликогена в трихинеллах. Максимальную положительную реакцию на присутствие гликогена у трихинелл проявляют стихоциты – клетки стихозомы, хорошо выраженные на переднем конце тела. Сильная реакция с Шифф-йодной кислотой (ШИК) характерна также для гиподермы и плазматических сумок соматических мышечных клеток: гликоген в них концентрируется в плотные глыбки [39].

Пищеварительная система половозрелых трихинелл представлена ротовым отверстием, пищеводом, стихозомой, состоящей приблизительно из 50 клеток, и кишечником. Передняя четверть пищевода хорошо различима и заканчивается псевдобульбусом, затем пищевод окружен с трех сторон стихозомой, свободная сторона пищевода покрыта тканью, состоящей из мышечных элементов. По Геллеру Э.Р. [30] каждый стихоцит покрыт оболочкой в 50 А толщиной, а расстояние между ними достигает 200 А. Клетки имеют зернистую структуру, содержащую гликоген. Тимонов Е.В. [82] наблюдал чередование стихоцитов в люминесцентном микроскопе на живых трихинеллах. Переверзева Э.В. [60] показала, что стихоциты неоднородны по своей природе. Наблюдается чередование зернистых и незернистых клеток. Считается, что стихоциты выделяют пищеварительный сок, поступающий в просвет пищевода, а также выполняют роль депо для резервных веществ [46].

При длине самцов *T. spiralis* 1,4-2,1 мм стихозома имеет длину до 0,51 мм, при длине самок 3-4 мм – до 0,55 мм, при длине личинок 0,8-1 мм – до 0,55 мм. При длине самцов *T. pseudospiralis* 0,6-1,1 мм длина стихозомы составляет 0,27-0,50 мм, самок при длине тела 1,26-2,10 мм – 0,32-0,4 мм, личинок при длине тела 0,65-0,85 мм – 0,38-0,48 мм [27, 28].

Пенькова Р.А. [59] отмечает, что у *T. pseudospiralis* установлено меньшее число стихоцитов (49-54 у самцов и 39-42 у самок по сравнению с 53-59 и 44-47 у самцов и самок *T. spiralis* и *T. nativa*) и несколько иная форма этих клеток.

В ряде случаев удастся проследить динамику депонирования и расходования энергетических компонентов на различных этапах жизненного цикла паразитов.

Накопление и расходование гликогена на протяжении жизненного цикла трихинелл

Мышечные личинки *Trichinella spiralis* чрезвычайно богаты гликогеном, составляющим 16% от их сухой массы [98, 112, 155]. Трихинеллы обладают полным циклом трикарбоновых кислот и имеют аэробный обмен веществ [140, 169], но, по всей видимости, его роль не так велика на мышечной стадии развития за счет низкой активности некоторых ферментов [104].

Освобождение личинок трихинелл от капсул начинается сразу же при попадании их в желудок и происходит одновременно с перевариванием мышц. Энергетический баланс трихинелл в первые часы развития в кишечнике хозяина характеризуется очень высокими затратами, связанными с внедрением в слизистую кишечника, органогенезом, подготовкой к размножению и процессом первой линьки. В работе Kozar Z. и др. [163] указывается, что трихинеллы не накапливают гликоген, а используют его запасы, образовавшиеся на личиночной стадии развития. В этот период стихоциты уменьшаются в длину с 55 до 35 мкм. Из-за слабой проницаемости кутикулы на данном этапе развития запасенный питательный материал поступает в среднюю кишку и расщепляется там до олиго- и моносахаридов. Последние проходят через стенку средней кишки, состоящей, как известно, из однослойного эпителия, в схизоцель, а оттуда — к другим внутренним органам. В длину самка к 6 дню после заражения вырастает с 1,27 до 3,3 мм, самец до 2,1 мм (*T. spiralis*). Сравнение размеров всей трихинеллы и органов, расположенных в переднем, среднем и заднем отделах тела, позволяет

сделать вывод, что рост паразита происходит в основном за счет участка тела, соответствующего средней кишке [83, 84].

После 20 часов развития в кишечнике хозяина функцию питания и удаления метаболитов у трихинелл принимает на себя кутикула, проницаемость которой к этому сроку увеличивается в 8 раз. Поступлению пищевых мономеров, кислорода, воды и низкомолекулярных и органических соединений через кутикулу и доставке их ко всем органам способствуют энергичные движения трихинеллы, которые наблюдаются при 37-38°C. Но до этого момента трихинеллы находятся в сильной зависимости от накопленных ранее запасов энергетических веществ [84, 163]. Методами электронной микроскопии гликоген перестает выявляться у кишечных трихинелл в период с 14 до 30 ч после инвазии [260]. Ferguson J.D. [136] определил, что через сутки после инвазии содержание гликогена в трихинеллах очень низкое и составляет всего 0,7% на сухой вес нематоды. К 4-ым суткам этот показатель поднимается до 1,3%. Kilgore M.W. [155] детектировал несколько большее содержание гликогена у 4-дневных трихинелл – 4,9%. Относительно низкое количество гликогена, присутствующее у взрослых трихинелл, лежит в основе их неспособности выживать *in vitro* более 12 ч при отсутствии экзогенной глюкозы. Тимонов Е.В. [84] установил, что пребывание трихинелл в кишечнике голодающих мышей более двух суток приводит к необратимым изменениям, вызывающим деструкцию и гибель паразитов, а при содержании их в изолированной петле кишечника хомяка наблюдается задержка в развитии.

После 20 часов развития проницаемость кутикулы трихинелл практически не изменяется, средняя кишка ее свободна от пищевых масс, но она не атрофируется. При изменениях нормальных условий в кишечнике хозяина (полное отсутствие экзогенной пищи) наблюдаются интенсивная вакуолизация стихозомы, резкое уменьшение содержания гликогена и появление каплевидного содержимого в средней кишке [84].

Обращает на себя внимание факт наличия взаимосвязи приживаемости в кишечнике с возрастом личинок. Геллер Э.Р. и Гридасова Л.Ф. [29] установили,

что приживаемость мышечных восьмимесячных личинок в кишечнике белых мышей больше, чем двухмесячных. Вероятно, при дальнейшем увеличении возраста личинок приживаемость их снижается, так как при заражении крыс 32-месячными личинками через 10 часов в кишечнике была обнаружена лишь одна трихинелла.

У самок 40-часового возраста в матке обнаруживаются первые яйца. Развивающиеся эмбрионы трихинелл имеют очень тонкую оболочку. У них отсутствуют желточные клетки и запасы гликогена. Следовательно, питание эмбриона возможно за счет веществ, содержащихся в полости матки. На третьи-четвертые сутки самки начинают отрождать личинок. Они содержат незначительное количество гликогена [82, 161].

Молодые трихинеллы имеют нитевидную форму и длину 0,12–0,18 мм. Попав в лимфатические щели стенок тонких кишок, они с током лимфы заносятся в грудной лимфатический проток, затем попадают в кровь и разносятся по организму. В период миграции личинки находятся в крови незначительное время, не изменяются морфологически и не растут. Мигрирующие личинки, видимо, способны усваивать через покровы пищевые мономеры из крови и лимфы, так как кутикула их обладает высокой проницаемостью. Миграция по крови у мышей продолжается до 12 дня после заражения. После внедрения в мышечные волокна, где ювенильные личинки находят все необходимые условия для развития, начинается интенсивный органогенез, трихинеллы увеличиваются в размерах более, чем в 10 раз, притом рост личинок происходит сначала больше в ширину, чем в длину [84].

С 7 дня инвазирования личинки вызывают усиленный гликолиз близлежащих клеток и начинают накапливать глюкозу и синтезировать гликоген. Трихинеллы становятся инвазионными на 16-17 день после заражения, когда у большинства личинок заканчивается органогенез. По результатам биопробы основная масса личинок становится инвазионными к 19-20 дню после заражения. Накопление гликогена инвазионными личинками играет несомненную роль в

выживаемости их в мышцах и приживаемости в кишечнике, а также в наступлении половой зрелости [29, 46, 73, 82].

Wu Z. с соавт. [257] установил, что уровень глюкозы в крови у инвазированных мышей ниже, чем у неинвазированных животных в период между 4 и 28 днем после инвазии. Также отмечено увеличение содержания гликогена в пораженных мышцах между 8 и 24 днем после заражения. Исследователи выяснили, что на фоне гипогликемии крови и увеличения уровня гликогена в инвазированных мышцах животных запасы резервного полисахарида в личинках быстро увеличиваются между 14 и 28 днем после заражения. Stewar G.L. [231] и Переверзева Э.В. [61] также отмечали в этот срок значительный прирост гликогена, более чем в 2 раза.

Накопление гликогена повышалось в инфицированных мышечных клетках в период гипогликемии, которая является результатом увеличения поглощения глюкозы пораженными клетками за счет регуляции сигнального пути инсулина, например, повышения экспрессии генов, кодирующих белки IR (инсулиновый рецептор) и Akt2 (протеинкиназа B). После этого срока содержание гликогена в мышечной ткани возвращается в норму или снижается относительно контрольных животных [231, 257].

С 15-го дня после заражения личинки начинают скручиваться, изгибаться дугообразно или в виде петли. Формирование начальной капсулы внутри мышечного волокна начинается на 20-24 сутки, а через 2-3 месяца после заражения образуется отчетливая двуслойная капсула [73]. В наружном слое капсулы проявляется умеренная реакция на присутствие кислых полисахаридов; в интракапсулярной саркоплазме гликоген отсутствует [40].

Быстрый рост личинки, формирование внутренних органов и накопление гликогена, главным образом в стихозоме, связаны с поступлением в развивающуюся мышечную трихинеллу большого количества питательных веществ в виде пищевых мономеров в начале, т.е. до сформирования пищеварительной трубки, только через покровы, а позже, с начала инкапсуляции, — через стенку капсулы и кутикулу паразита. Перенос глюкозы против градиента

концентрации к гельминту обеспечивается за счет механизмов активного транспорта [9]. Проницаемость кутикулы уменьшается у сформированных живых инкапсулированных мышечных личинок в 13 раз по сравнению с мигрирующими, что объясняется снижением метаболических процессов. Стенка капсулы и кутикула личинки являются полупроницаемыми, обеспечивающими транспорт незначительного количества питательных веществ в латентную трихинеллу и удаление продуктов жизнедеятельности. Содержание гликогена постепенно увеличивается, достигая максимума к 6 месяцам, а в последующие месяцы начинает уменьшаться [61, 83, 104]. В паразито-хозяйинной системе устанавливается динамическое равновесие [84].

2.3. Энергетический метаболизм у фасциол

Содержание и локализация гликогена на разных этапах развития фасциол

В половозрелых фасциолах содержание гликогена составляет 4% от сырой массы [174], или 15-21% от сухой массы [144]. Основным местом локализации резервного полисахарида, как и у других трематод, служит паренхима. Бибик О.И. и Начева Л.В. [12] отметили, что особенно богата гликогеном зона паренхимы вблизи тегумента. Во внутренней части самого тегумента полисахарид встречается в малом количестве и, как правило, представлен мелкими гранулами [12, 252]. Много гликогена обнаруживается в кортикальном [78] и базальном слое тегумента, мышечных клетках, желточниках [145, 198, 252].

Запасы гликогена в *F. hepatica* интенсивно используются в период яйцепродукции [80]. В цитоплазме желточных клеток, поступающих в яйцо, содержится много гликогена, также встречаются капли жира [32, 256]. По данным Threadgold L.T. [239], α - и β -частицы гликогена составляют 20% от объема цитоплазмы желточных клеток, а липиды – 3%. Таким образом, яйца фасциол богаты запасными веществами.

Свободноживущие личиночные стадии развития фасциол не питаются и существуют за счет энергии, получаемой в результате расщепления эндогенных резервов. Сообщается, что в качестве источника энергии в процессе

формирования мирацидия используется 38% (по массе) содержимого яиц [256]. Мирацидии, вышедшие из яиц фасциол после 2-4 недель развития, содержат мало гликогена, но его количества достаточно для обеспечения личинок энергией на протяжении суток для поиска нового хозяина [86, 92, 107]. Они обладают аэробным метаболизмом вследствие функционирующих цикла трикарбоновых кислот и дыхательной цепи переноса электронов и не приспособлены к существованию в анаэробной среде, в отличие от адолескариев. Установлено, что гликоген является основным, если не единственным источником энергии мирацидиев [107, 109, 149, 191]. Полисахарид обнаруживается в паренхиме тела и эпителиальных пластинках – ресничных клетках, обеспечивающих движения в период свободной жизни, и имеет вид мелких и крупных гранул. При нахождении мирацидия во внешней среде гликоген пластинок расходуется по определенному градиенту, начиная с переднего конца. В момент внедрения в тело хозяина-моллюска эпителиальные пластинки отбрасываются, подобно хвосту церкарий. Гликоген же, содержащийся в теле личинки, остается единственным источником энергии, необходимой для преодоления тканевых барьеров промежуточного хозяина и миграции. Внедрившемуся мирацидию необходимо наличие исходного запаса гликогена для восприятия углеводов из гемолимфы моллюска [86].

Развитие партенит трематод в моллюске проходит в течение 2,5-3 месяцев и характеризуется резким уменьшением запасов гликогена хозяина [54]. Спороцисты фасциолы овец имеют большое количество гликогена, который размещен диффузно в стенках партенит. По размерам гранулы гликогена мелкие. Меньшее количество гликогена зарегистрировано в теле спороцист, полученных из яиц фасциолы от крупного рогатого скота. Большое число гранул и глыбок гликогена отмечается в мускульной глотке редий. Много гликогена сосредоточено в теле «зрелых» церкарий и мало — в «незрелых» [86, 191].

Церкарии трематод после выхода во внешнюю среду не питаются и живут исключительно за счет накопленных во время развития в моллюске-хозяине питательных веществ. Основным путем получения энергии является цикл Кребса [149]. Энергетические запасы церкарий сосредоточены в виде двух независимых

пулов: в хвосте и в теле личинки. В процессе жизнедеятельности церкарий в первую очередь используется гликоген, локализующийся в активных и подвижных частях их тела. Истощение запасов гликогена в хвосте во время плавания приводит к иммобилизации. Церкарии превращаются в адолескарии [33, 38, 67, 85, 86].

Адолескарии фасциолы содержат большое количество гликогена в третьем внутреннем слое личинки. В центральной части личинки гликогена мало, в области первого и второго слоев адолескария наблюдаются лишь следы гликогена.

Количество и распределение запасов гликогена в теле личинок трематод, равно как и характер его расходования всецело определяется особенностями экологии и жизненного цикла [33, 86].

Переход от аэробного метаболизма адолескариев к анаэробному метаболизму мариит

Tielens A.G.M. с соавт. [244] показал, что при инкубировании *in vitro* эксцистированных адолескариев в присутствии кислорода выделяется углекислый газ и незначительные количества ацетата. В анаэробных условиях глюкоза превращается главным образом в пропионат и ацетат в молярном соотношении 2:1, также образуется лактат. Поэтому авторы полагают, что физиологически адолескарии уже подготовлены к бескислородному существованию.

Приспособление к анаэробной среде в течение первых суток после эксцистирования обеспечивается за счет имеющихся запасов гликогена [124]. В процессе развития ювенильные фасциолы постепенно адаптируются к анаэробному образу жизни, так как по мере роста получают все меньшее количество кислорода, который поступает к тканям путем диффузии. Продемонстрировано, что активность цикла Кребса в развивающейся *F. hepatica* прямо пропорциональна площади поверхности трематоды. Аэробный внешний слой у половозрелых фасциол составляет менее 1% от общего объема тела, что позволяет отнести их метаболизм к анаэробному [242, 243, 245].

После 12 суток развития основным конечным продуктом при аэробной инкубации становится ацетат. Конечные продукты катаболизма глюкозы 25-дневных фасциол в аэробной среде представляют собой ацетат и пропионат в молярном соотношении 2:1, CO_2 и малые количества лактата; в анаэробной среде выделяется преимущественно пропионат. На 77 сутки развития продукция пропионата в качестве основного конечного продукта отмечается и при инкубации в аэробных условиях. К 114 суткам это соотношение увеличивается (рис. 2) [242, 245].

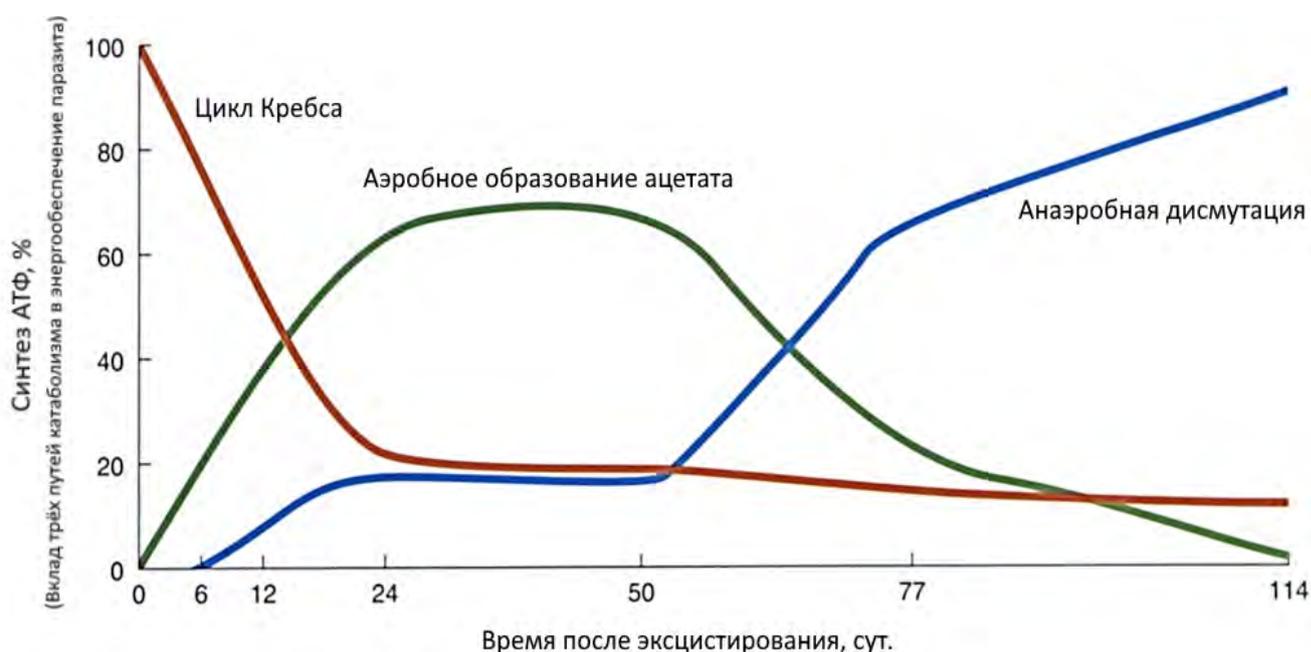


Рисунок 2 – Изменения в энергетическом метаболизме *F. hepatica* в процессе развития после эксцистирования [242].

Ранние сравнительные исследования метаболизма у неполовозрелых 3-недельных и взрослых *F. hepatica* продемонстрировали, что у молодых особей имеет место более слабый поток глюкозы через гликолиз, так как меченая глюкоза утилизовалась с половинной скоростью от скорости, характерной для взрослых трематод [255].

Отличия метаболизма ювенильных и взрослых фасциол находят свое отражение в разной восприимчивости к ряду антигельминтных средств [154].

Катаболизм углеводов у имагинальных фасциол

Изучению катаболизма углеводов у имагинальных трематод *F. hepatica* посвящено много обстоятельных работ, представленных такими авторами, как Tielens A.G.M [243, 245], Lloyd G.M. [172, 173, 174], Barrett J. [96], Williams J.P.G. [255], Bryant C. [109], Behm C.A. [100, 101], Prichard R.K. [206, 208, 209, 210], Mansour T.E. [179, 180, 181, 182] и др.

Имагинальные *F. hepatica* обитают в среде с низким содержанием кислорода [193]. Несмотря на присутствие у фасциол всех ферментов и промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот, его физиологическое значение из-за низкой активности некоторых ферментов невелико, а метаболизм является практически полностью анаэробным [109, 173, 206, 208]. При фасцилезе в пораженной печени хозяина отмечается снижение уровня запасного полисахарида [139]. В самой трематодке значительных колебаний концентрации гликогена, как у кишечных гельминтов, не наблюдается.

В исследованиях *in vitro* показано, что в зависимости от доступности глюкозы и кислорода в метаболизме фасциол преобладают те или иные катаболические пути, характеризующиеся разными конечными продуктами и энергоэффективностью, а значит, и разной скоростью утилизации резервных веществ. В бескислородной среде, содержащей глюкозу (аналогично среде обитания *F. hepatica*), наблюдается тип метаболизма с относительно низким выходом АТФ на единицу окисленной глюкозы: 4,6 моль по сравнению с 5,3-5,5 моль в среде с другими условиями. Следовательно, метаболизм фасциол переключается с преобладающего пути катаболизма глюкозы, приводящего к образованию пропионата (6 моль АТФ/моль глюкозы), на менее энергоэффективные пути, в том числе, гомолактатную ферментацию (2 моль АТФ/моль глюкозы) [173]. Исходя из представленных Lloyd G.M. и Barrett J. [174] данных, можно заключить, что если в окружающей среде глюкоза отсутствует, то гомолактатная ферментация не вносит какого-либо значимого вклада в энергетику фасциол и в аэробных, и в анаэробных условиях, поскольку лактат выделяется лишь в следовых количествах. По всей видимости, только в

присутствии экзогенной глюкозы (или ее эквивалентов) фасциолы используют малоэффективные энергетические пути. Буренина Э.А. [24] связывает такое переключение обменного потока с предотвращением избыточного накопления метаболитов.

Ключевой точкой расхождения анаэробного метаболизма служит фосфоенолпируват (ФЕП). Он может карбоксилироваться фосфоенолпируваткарбокскиназой (ФЕПКК) в оксалоацетат или дефосфорилироваться пируваткиназой (ПК) в пируват. Образовавшийся пируват под действием лактатдегидрогеназы (ЛДГ) превращается в лактат. Конечными продуктами катаболизма оксалоацетата являются ацетат и пропионат (рис. 3).

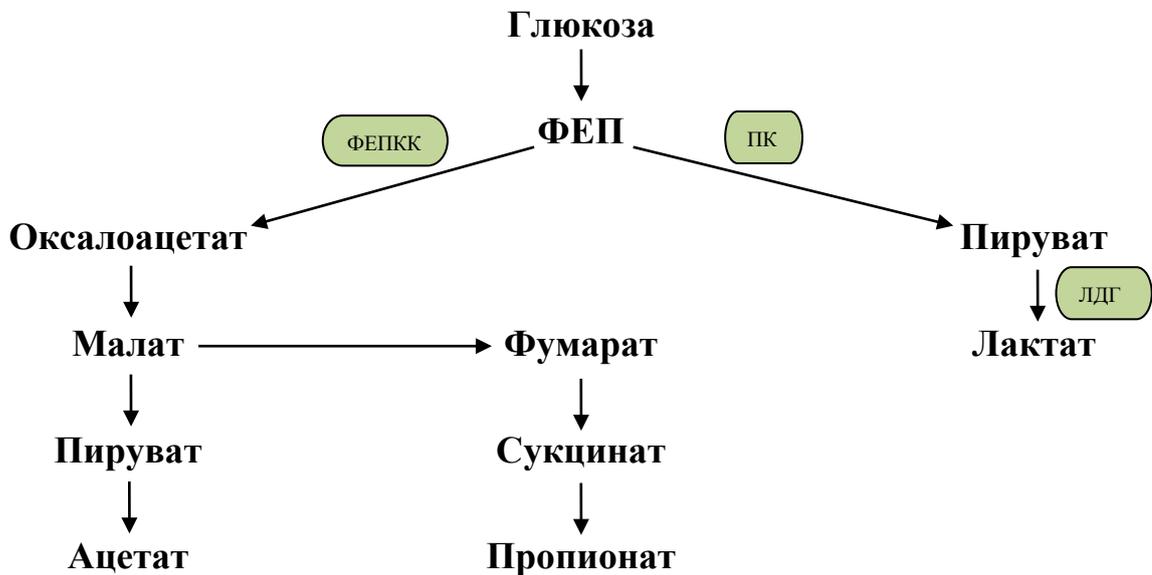


Рисунок 3 – Пути катаболизма ФЕП у фасциол

Расхождение метаболических путей на уровне ФЕП связано с тонкими различиями между ферментами, конкурирующими за данный субстрат. Регулирование активности ФЕПКК и ПК направляет анаэробный метаболизм на определенное соотношение продуктов ферментации, которое будет зависеть от преобладающих условий окружающей среды. Считается, что оба фермента являются аллостерическими [209, 210].

Активность ФЕПКК, по-видимому, зависит от концентрации субстратов и продуктов реакции, ионов металлов, в частности Mg^{2+} и Mn^{2+} , а также от pH

окружающей среды, оптимальное значение которого находится в интервале 5,8-6,2. Фермент менее чувствителен к низким концентрациям ФЕП, по сравнению с ПК. Сильными ингибиторами ФЕПМК являются нуклеозидтрифосфаты: 5 мМ АТФ или инозинтрифосфат (ИТФ) полностью инактивируют фермент [100, 173].

Активность ПК находится под жестким аллостерическим контролем. Известно, что добавление фруктозо-1,6-бисфосфата и катионов Mg^{2+} и Mn^{2+} в систему анализа ПК значительно увеличивало сродство фермента к ФЕП. Наибольшую активность фермент проявляет при рН около 7. Ингибиторами, опять же, являются нуклеозидтрифосфаты. АТФ и ИТФ в концентрации 5 мМ вызывают ингибирование фермента на 81 и 46%, соответственно. Степень ингибирования, однако, намного меньше, чем у ФЕПМК. ПК, вероятно, имеет некоторое преимущество при высоких значениях рН и низких уровнях ФЕП, но ее общая конкурентоспособность ограничена значительно более низкой концентрацией фермента в цитозоле [100, 101, 173].

ЛДГ фасциол также активируется фруктозо-1,6-бисфосфатом [172]. Гистохимически показана высокая активность ЛДГ в тегументе и эпителиальном слое кишечника трематод [97].

Таким образом, увеличение концентрации бисфосфата фруктозы на фоне физиологических уровней АТФ будет сдвигать катаболизм в сторону наименее энергоэффективного пути. Это может объяснить причину, по которой лактат вырабатывается в значительных количествах только в присутствии глюкозы во внешней среде [251].

2.4. Методические проблемы определения содержания гликогена в гельминтах

Мобилизация резервов гликогена при недостатке экзогенных питательных веществ в исследованиях in vitro

Колебания уровня АТФ влияют на поступление углеводов в процесс гликолиза, поскольку он действует как субстрат и регулятор гексокиназы, гликогенфосфорилазы и фосфофруктокиназы. Таким образом, поток АТФ за счет

гликолиза резко увеличивается, и запасы гликогена используются до тех пор, пока необходимость в энергии превышает ее продукцию.

Гистохимическими методами описана мобилизация резервов гликогена *F. hepatica* при инкубации в безуглеродной среде [174]. После 12 ч голодания в паренхиме наблюдается истощение запасного полисахарида. Спустя 24 ч отмечается снижение его содержания и в мышечных клетках. При этом в желточниках уровень гликогена остается практически без изменений, как и в маточных яйцах. Mansour T.E. [180] и von Brand T. [252] показали, что фасциола, голодавшая в течение 24 ч *in vitro*, повторно синтезировала почти весь гликоген после добавления в среду глюкозы. При этом полисахарид откладывался в основном в паренхиме, где до этого тратился. Во время голодания в большей степени исчезал гликоген с высокой молекулярной фракцией, чем с низкой. Подобный характер и последовательность расходования гликогена у трематод отмечены Бибик О.И. [15].

Tielens A.G.M. с соавт. [242] установил, что при аэробной инкубации *in vitro* в отсутствие сахаров ювенильные эксцистированные фасциолы за 5 ч израсходовали около 40% гликогена. Дальнейшая инкубация с глюкозой в течение 11 ч привела к восстановлению и даже увеличению запасов гликогена по сравнению с исходным количеством.

Lloyd G.M. и Barrett J. [174], используя спектрофотометрический метод определения концентрации гликогена по Montgomery R., заключили, что уровень гликогена у фасциол 84-дневного возраста после 24 ч инкубации с глюкозой (аэробно и анаэробно) сильно не изменяется. Скорость утилизации глюкозы оказалась различна и составила 476,3 мкмоль/г при аэробной инкубации и 609,3 мкмоль/г при анаэробной. В то же время в среде без углеводов наблюдается истощение резервов полисахарида с $41,4 \pm 0,4$ мг/г до $3,6 \pm 0,3$ мг/г (аэробно) и до $9,5 \pm 0,2$ мг/г (анаэробно). Авторы показали, что гликоген и глюкоза оказались единственным источником энергии, используемым *F. hepatica* во всех испытанных условиях, поскольку снижение уровня общих углеводов и гликогена оказалось параллельно. Было установлено, что в присутствии экзогенной глюкозы

скорость катаболизма углеводов у фасциол увеличивается примерно в 1-5 раз [173].

Фасциолы, как было описано, обладают разными ферментациями и способны подстраивать свой метаболизм к условиям окружающей среды. Это создает ряд трудностей для исследователей при проведении экспериментов *in vitro*, посвященным, в частности, изучению действия антигельминтных препаратов.

Так, Cornish R.A. и Bryant C. [120] сообщили о снижении уровня гликогена в контрольной группе фасциол на 50% через 20 ч и на 80% через 48 ч в исследованиях *in vitro* в среде без глюкозы. На фоне такого значимого уменьшения содержания гликогена исследователям не удалось зафиксировать воздействия антигельминтных препаратов на углеводный обмен трематод.

С похожей ситуацией столкнулись в своих исследованиях Van den Bossche H. и De Nollin S. [247]. Опыты не показали достоверного влияния мебендазола на содержание гликогена в половозрелых нематодах *Ascaris suum* в среде без глюкозы. В то же время инкубация аскарид в среде с глюкозой приводила к значительному уменьшению концентрации гликогена через 48 ч по сравнению с контролем, при этом скорость поглощения глюкозы была снижена с $161,38 \pm 61,27$ до $74,69 \pm 33,13$ мкмоль/г в сутки. Увеличение дозы антигельминтика в 2 раза сказалось на содержании гликогена уже после 24 ч инкубации.

Приведенные примеры наглядно иллюстрируют вывод о том, что для корректной оценки уровня гликогена в гельминтах в опытах *in vitro* необходимо учитывать особенности метаболизма выбранной модели и условий среды, в которой гельминт обитает на данной стадии развития. В противном случае, несмотря на некоторые преимущества исследований, проводимых *in vitro*, полученные результаты могут слабо отражать или даже исказить картину, по сравнению с исследованиями *in vivo*.

Методы детектирования гликогена в исследованиях антигельминтных препаратов

Поиск эффективных антигельминтных средств и выяснение механизма их действия сопровождается исследованиями содержания и депонирования гликогена для определения влияния препаратов на углеводный энергетический метаболизм гельминтов, как основу их жизнедеятельности. Для достижения упомянутых целей используются различные качественные и количественные химические и физико-химические методы определения гликогена (гистохимия, электронная микроскопия, спектрофотометрия).

Большой вклад в изучение механизма действия антигельминтных препаратов с помощью гистологических, гистохимических и морфометрических методов внесли российские ученые Начева Л.В. и Бибик О.И. [11, 13, 14, 16]. Для выявления гликогена ими использовалась ШИК-реакция по Мак-Манусу с ферментативным контролем – амилазой и диастазой. Авторы установили, что в трематодах после действия антигельминтиков истощаются резервы гликогена, описали, что прежде всего полисахарид исчезает из тегумента и кишечного эпителия, затем из паренхимы и мышечных клеток и в последнюю очередь из органов половой системы [15].

Электронная микроскопия (метод морфологического исследования объектов с помощью потока электронов) позволяет изучать структуру гельминтов на макромолекулярном и субклеточном уровнях, в том числе выявлять гранулы гликогена. Мобилизация энергетического резерва при эффективном воздействии антигельминтиков показана в работах de Nollin S. [128], Borgers M. [106], Buchanan J. F. [110], Pérez-Serrano J. [200], Moczon T. [189] и др.

Спектрофотометрические методы являются количественными и широко применяются исследователями для определения содержания гликогена в гельминтах до и после действия антигельминтных препаратов. Описано много вариаций проведения анализа, основанных на различных методических подходах. Очевидно, что результаты таких исследований слабо поддаются сопоставлению между собой непосредственным образом.

В таблице 1 представлены основные методы, используемые при оценке влияния антигельминтиков на содержание гликогена в гельминтах. Снижение уровня гликогена детектируется под воздействием химиопрепаратов различных классов: производных бензимидазола (альбендазол, мебендазол, триклабендазол, флюбендазол, тиабендазол, камбендазол), изохинолинов (празиквантел), циклических амидов (пирантела памоат), имидотиазола (левамизол), салициланилидов (рафоксанид, оксиклозанид, клозантел), тиазолидов (нитазоксанид) и др. Также исследуется влияние экстрактов различных растений, а в последние годы возник интерес к наночастицам, полученным биотехнологическим способом.

Таблица 1 – Опыт изучения влияния антигельминтиков на содержание гликогена в гельминтах

Объект исследования	Антигельминтный препарат	Метод определения гликогена	Авторы
<i>Fasciola hepatica</i>	альбендазол	электронная микроскопия	Buchanan J.F. и др., 2003 [110]
	триклабендазол	гистохимия	Hanna R., 2015 [145]
	мебендазол	спектрофотометрия	Rahman M.S. и др., 1977 [211]
	оксиклозанид + пирантела памоат	гистохимия	Бибик О.И. и др., 2012 [18]
	рафоксанид	спектрофотометрия	Cornish R.A. и др., 1977 [121]
	рафоксанид	спектрофотометрия	Prichard R.K., 1978 [209]
	клозантел	спектрофотометрия	Kane H.J. и др., 1980 [151]
<i>Trichinella spiralis</i>	альбендазол	гистохимия	Chen X. и др., 1999 [114]
			Xiaoning C., 1997 [259]
	мебендазол	спектрофотометрия	De Nollin S. и др., 1973 [127]
			электронная микроскопия
	мебендазол + левамизол	гистохимия	An C.L., 1990 [89]
тиабендазол	гистохимия	Kozar Z. и др., 1967 [162]	

Продолжение таблицы 1

<i>Echinococcus granulosus</i>	альбендазол	электронная микроскопия	Pérez-Serrano J. и др., 1994 [200]
	флюбендазол, альбендазол, нитазоксанид	спектрофотометрия	Cumino A.C. и др., 2009 [122]
	мебендазол, альбендазол	гистохимия	Xiao S.H. и др., 1990 [258]
	празиквантел	электронная микроскопия	Urrea-Paris M. A. и др., 1999 [246]
<i>Dicrocoelium lanceatum</i>	празиквантел	гистохимия	Бибик О.И. и др., 2016 [16]
	оксиклозанид	гистохимия	Бибик О.И., 2010 [15]
<i>Ascaris suum</i>	мебендазол	спектрофотометрия	Van den Bossche H., De Nollin S., 1973 [247]
		электронная микроскопия	Borgers M., De Nollin S., 1975 [106]
<i>Ascaris lumbricoides</i>	альбендазол, мебендазол	электронная микроскопия	Tao Z., Yiping S., 1997 [236]
<i>Hymenolepis diminuta</i>	тиабендазол, камбендазол	спектрофотометрия	McCracken R.O., Taylor D.D., 1983 [187]
	мебендазол	спектрофотометрия	Lipkowitz K.B., McCracken R.O., 1993 [171]
	тиоксидазол	спектрофотометрия	McCracken R.O., Lipkowitz K.B., 1990 [188]
<i>Hymenolepis microstoma</i>	циклоспорин А	спектрофотометрия	Wastling J.M., Chappell L.H., 1994 [253]
<i>Opisthorchis felineus</i>	альбендазол, флюбендазол, мебендазол, празиквантел	гистохимия	Бибик О.И., 1997 [17]
	мебендазол + празиквантел	гистохимия	Бибик О.И. и др., 2016 [19]
	празиквантел	гистохимия	Начева Л.В. и др., 2014 [57]
<i>Schistosoma mansoni</i>	празиквантел	спектрофотометрия	Harder A. и др., 1987 [146]
<i>Schistosoma haematobium</i>	ниридазол	электронная микроскопия	Moczon T., Swiderski Z., 1992 [189]
<i>Moniezia expansa</i>	мебендазол	спектрофотометрия	Rahman M.S. и др., 1977 [211]
	мебендазол, камбендазол	спектрофотометрия	Rahman M.S., Bryant C., 1977 [212]
<i>Cysticercus cellulosae</i>	альбендазол	гистохимия	Zhaojun C., 1989 [262]
	альбендазол, мебендазол	гистохимия	Peihui C. и др., 1996 [199]

Продолжение таблицы 1

<i>Eurytrema pancreaticum</i>	гексахлорэтан, оксинид	гистохимия	Начева Л.В., 1993 [56]
<i>Paramphistomum cervi</i>	оксиклозанид + пирантела памоат	гистохимия	Бибик О.И. и др., 2012 [18]
<i>Toxocara canis</i>	пирантел памоат, альбендазол	гистохимия	Aukštikalnienė R., Kublickienė O., 2000 [94]
<i>Setaria cervi</i>	левамизол	гистохимия	Baqui A., Khatoun H., 1982 [95]
<i>Litomosoides carinii</i>	левамизол	спектрофотометрия	Komuniecki P.R., Saz H.J., 1982 [159]
<i>Raillietina echinobothrida</i>	Растительный препарат (<i>Flemingia vestita</i>)	спектрофотометрия	Tandon V. и др., 2003 [235]
	Растительный препарат (<i>Lysimachia ramosa</i>)	спектрофотометрия	Dey P., Roy B., 2020 [130]
<i>Hymenolepis nana</i>	Растительный препарат (<i>Artemisia absinthium</i>)	электронная микроскопия	Beshay E.V.N., 2018 [103]
<i>Haemonchus contortus</i>	Растительный препарат (<i>Ziziphus jujuba</i>) и наночастицы серебра	спектрофотометрия	Preet S., Tomar R.S., 2017 [205]

Механизм действия антигельминтиков из группы бензимидазолов, по сравнению с другими химиопрепаратами, является одним из наиболее изученных по настоящее время. Тем не менее, фактически, раскрыто только несколько звеньев метаболического ответа гельминтов на примере различных модельных объектов и в различных условиях эксперимента (что говорит о невозможности унифицирования таких данных). В частности, помимо разложения гликогена, в ряде работ приводятся сведения об уменьшении активности фумаратредуктазы [138, 170, 207], нарушении функции микротубул [166, 197, 229] и снижении поглощения глюкозы в гельминтах [170, 219, 249].

Усиленный катаболизм гликогена, по всей видимости, является общей неспецифической реакцией при эффективном воздействии химиопрепарата, направленном не только непосредственно на энергетический метаболизм

паразита, но также и на другие функциональные элементы его обмена веществ, что открывает широкий простор для исследований в данной области. Следовательно, востребованы чувствительные, воспроизводимые, простые и экономичные количественные методы определения содержания гликогена.

Совершенствование методических подходов к определению содержания гликогена

Традиционные методы определения содержания гликогена основаны на его преципитации этиловым спиртом, гидролизе и измерении концентрации свободной глюкозы с помощью различных реактивов. К наиболее известным из применяемых в гельминтологии относятся методы Montgomery R. [190] с конканавалином А, Seifter S. [222] с антроном, Pfleiderer G. [201] с ферментной системой. Такие методы нельзя назвать специфическими, поскольку полученные результаты отражают суммарное содержание углеводов в исследуемых образцах, включая свободную глюкозу и другие редуцирующие сахара.

Качественная реакция гликогена с йодом, сопровождающаяся изменением окраски, легла в основу спектрофотометрических методов, основанных на определении концентрации непосредственно молекул гликогена. Первые опыты продемонстрировали сильную зависимость результатов от температуры и концентрации йода в исследуемых растворах и указали на необходимость оптимизации данной методики [192].

Krisman C.R. [165] определила оптимальную для проведения анализа концентрацию йода и предложила использовать насыщенные растворы хлорида кальция и хлорида аммония для повышения чувствительности метода. Хлорид кальция ослаблял влияние температуры на оптическую плотность растворов с 37% до 11% в интервале 10°C, а хлорид аммония уменьшал рН среды (при рН>7,0 образуется гипойодид и снижается оптическая плотность растворов).

В 2010 году Данченко Е.О. и Чиркин А.А. [37] апробировали и адаптировали модифицированный Krisman C.R. метод для применения в области судебно-медицинской экспертизы.

По настоящее время специфических спектрофотометрических методов определения концентрации гликогена в гельминтах в доступных источниках литературы не найдено.

Подводя итог анализу литературного обзора, можно заключить, что гельминты, в силу особенностей биологии и закономерностей развития, обладают варьирующими в зависимости от условий среды путями энергетического метаболизма, ключевым звеном которых является резервный субстрат – гликоген. Динамика его содержания отражает состояние энергетического метаболизма гельминтов, характеризует их реактивность на воздействие внешних факторов. Для точной и объективной оценки содержания данного полисахарида необходимо использование специфичных методов анализа. Поэтому доработка одного из таких методов и изучение возможности его применения в области паразитологии является основным направлением настоящего исследования.

3. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основные исследования по теме диссертации были проведены на экспериментальной базе лаборатории паразитарных зоонозов «Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрябина» («ВНИИП») – филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и в его виварии с 2018 по 2021 г.

Объекты исследования

Культура свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans* штамм Bristol N2 (wild-type) и бактериальная культура *Escherichia coli* OP50, входящая в состав ксенической питательной среды, были получены из коллекции Института проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова (ФГБУН ИПЭЭ РАН), где поддерживались по стандартной методике на агаризованных питательных средах [232].

Изолят личинок трихинелл *T. spiralis* был выделен на Минском мясокомбинате (Белоруссия) от свињи (*Sus scrofa domesticus*) породы Крупная белая [75].

Изолят личинок *T. nativa* выделен от рыжей лисицы (*Vulpes vulpes*), отловленной в 2011 г. в Шиловском районе Рязанской области России. Принадлежность к данному виду подтверждена результатами молекулярно-генетических исследований (изолят “TN_Ryazan”; GenBank Accession number: MN 969995) [47].

Изолят личинок *T. pseudospiralis* выделен в свиноводческом хозяйстве Камчатского края от свињи в 2011 г. [77].

Культуры возбудителей трихинеллеза, используемые в данной работе, с момента получения и по настоящее время поддерживаются пассированием на беспородных белых крысах в условиях вивария ВНИИП – филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

Возбудитель фасциолеза, трематода *Fasciola hepatica*, выделен в 2015 г. из печени овцы Романовской породы, содержащейся в крестьянско-фермерском хозяйстве Ярославского региона. Промежуточный хозяин, малый прудовик (*Lumnaea truncatula*), выделен из естественных биотопов Дмитровского района Московской и Брянской областей в 2013 г. и круглогодично поддерживается в условиях лаборатории по методике Постевого А.Н. и др. [63]. Культура адолескариев *F. hepatica*, полученная при искусственном выводе церкариев из промежуточного хозяина, хранится на фрагментах листьев пырея ползучего (*Elytrigia repens*) в дистиллированной воде при температуре 6 ± 2 °С.

В качестве лабораторной модели инвазии изучаемых возбудителей использовали белых крыс линии Вистар, для постановки биопробы – мышей линии C57BL/10 и монгольских песчанок.

Грызунов содержали в виварии в соответствии с требованиями руководства по содержанию и уходу за лабораторными животными [40], методическими рекомендациями (РД-АПК 3.10.07.02-09) [69] и государственным стандартом (ГОСТ 33216-2014) [35].

Культивирование бактериальной культуры E. coli

Культивирование бактериальной культуры *E. coli*, использующейся в составе ксенической среды для нематод *C. elegans*, проводили на агаризованной питательной среде LB (Lennox Broth) [232].

Приготовление среды осуществляли следующим образом. В 1 л дистиллированной воды при нагревании растворяли 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г хлорида натрия, 15 г бактериологического агара. рН (7,5) довели с помощью 1 М раствора соляной кислоты и 1 М раствора гидроксида натрия. Стерилизацию среды проводили в автоклаве в течение 20 мин при 121 ± 1 °С. После охлаждения до 50 ± 5 °С среду стерильно разливали в чашки Петри. Готовую среду считали стерильной при отсутствии признаков роста микрофлоры (появления колоний) после инкубирования в течение 2-3 суток в термостате при 37 ± 1 °С.

Инкубирование посевов культуры *E. coli* осуществляли в термостате при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ч.

Для приготовления рабочего запаса культуру смывали с поверхности агаризованной среды стерильной дистиллированной водой, переносили в стерильные пробирки и хранили при температуре $4\pm 2^\circ\text{C}$ в бытовом холодильнике.

Для длительного хранения смывы бактериальной культуры разливали в стерильные пробирки, добавляли глицерин (20% по объему) и замораживали. Хранили при температуре -18°C .

Культивирование нематоды C. elegans

Культивирование свободноживущей нематоды *C. elegans* осуществляли на агаризованной питательной среде NGM (Nematode Growth Medium) согласно общепринятой методике [232].

Процесс приготовления среды NGM включает подготовку основы питательной среды, 1 М раствора хлорида кальция, 1 М раствора сульфата магния, калий-фосфатного буфера (108,3 г дигидрофосфата калия, 35 г гидрофосфата калия в 1 л дистиллированной воды; pH 6,0) и раствора холестерина в этаноле (5 мг/мл). Для приготовления основы питательной среды в 975 мл дистиллированной воды при нагревании растворяли 2,5 г пептона, 3 г хлорида натрия, 15 г бактериологического агара. Основу для питательной среды и растворы (кроме раствора холестерина в этаноле) стерилизовали в автоклаве в течение 20 мин при $121\pm 1^\circ\text{C}$. После охлаждения до $50\pm 5^\circ\text{C}$ в стерильных условиях вносили в основу питательной среды 1 мл 1 М раствора хлорида кальция, 1 мл 1 М раствора сульфата магния, 25 мл буфера и 1 мл раствора холестерина в этаноле. Тщательно перемешивали и разливали по чашкам Петри, заполняя их на 2/3 объема. Готовую среду считали стерильной при отсутствии признаков роста микрофлоры после инкубирования в течение 2-3 суток в термостате при $37\pm 1^\circ\text{C}$.

Бактериальную суспензию пипеткой вносили на агар NGM по 0,1-0,2 мл, используя материал из рабочего запаса культуры *E. coli* (предварительно нагретый до комнатной температуры $22 \pm 2^\circ\text{C}$).

Пересев *C. elegans* осуществляли переносом части агара с нематодами или смывом стерильным буфером М9. Для приготовления буфера М9 в 1 л дистиллированной воды растворяли 3 г гидрофосфата калия, 6 г гидрофосфата натрия, 5 г хлорида натрия и 1 мл 1 М раствора сульфата магния и стерилизовали в автоклаве в течение 20 мин при $121 \pm 1^\circ\text{C}$.

Для получения биомассы нематод инкубирование проводили в термостате при температуре $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Указанный температурный режим, согласно литературным данным [111], является оптимальным для развития свободноживущих нематод.

Поддержание культуры, в целях повышения экономической эффективности, осуществляли при $15 \pm 1^\circ\text{C}$, так как при более низкой температуре замедляются процессы метаболизма, роста и развития *C. elegans* [148, 156], а пул питательных веществ среды истощается дольше. Пересев нематод проводили раз в 1-2 месяца.

Заражение лабораторных животных

Для моделирования трихинеллеза лабораторных крыс инвазировали личинками трихинелл в дозах 5 личинок на г массы тела животного (*T. spiralis*), 20 личинок на г (*T. nativa*), 75 личинок на г (*T. pseudospiralis*).

Для моделирования фасциолеза крыс заражали в дозе 20 адолескариев *F. hepatica* на животное [6].

Лабораторных животных заражали перорально суспензией личинок в физиологическом растворе с помощью стеклянного шприца объемом 2 мл и иглы Ананьева (для новокаиновых блокад с напаянной на конце оловянной канюлей).

Выделение гельминтов

Зараженных крыс подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации. Данный способ используется в соответствии с указаниями по эвтаназии грызунов Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях [133].

Личинки трихинелл выделяли методом пассивного переваривания в искусственном желудочном соке (ИЖС) по Березанцеву Ю.А. [10] и автоматизированного пептолиза с использованием аппаратов типа (серии) АВТ. Искусственный желудочный сок готовили путем растворения в 1 л воды 10 мл концентрированной соляной кислоты и 3 г пепсина (Acros Organics, Бельгия, США).

Половозрелых трихинелл выделяли методом гельминтологического вскрытия тонкого кишечника. Тонкий кишечник по всей длине препарировали глазными ножницами, разрезали на фрагменты, помещали в физиологическом растворе в аппарат Бермана и ставили на 6 ч в термостат при температуре $38\pm 2^\circ\text{C}$. По истечении указанного времени собирали осадок с нематодами и переносили в пробирку.

Для выделения возбудителя фасциолеза *F. hepatica* проводили гельминтологическое вскрытие по К.И. Скрябину [78].

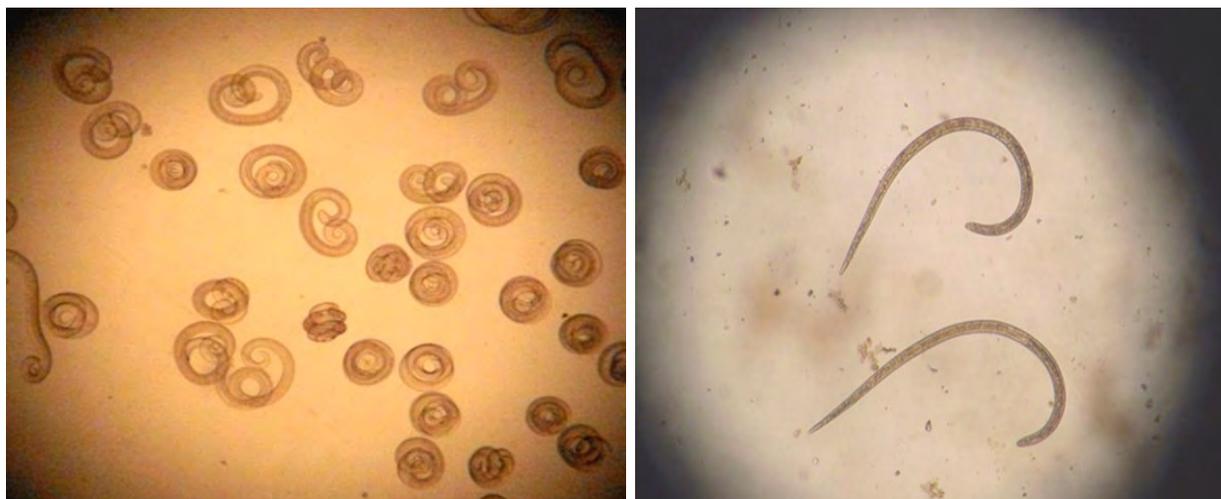
Полученный биоматериал промывали стерильным физиологическим раствором 3-5 раз.

Определение жизнеспособности

Определение жизнеспособности личинок трихинелл проводили согласно методике, разработанной Скворцовой Ф.К. и др. [74]. Отобранных личинок гельминтов помещали на часовое стекло в тонком слое физиологического раствора и микроскопировали. Признаком жизнеспособности личинок являлась двигательная активность при нагревании среды до $37\pm 1^\circ\text{C}$. Дополнительным признаком, характеризующим жизнеспособность личинок трихинелл, служила их способность сворачиваться в характерную тугую спираль (рис. 4).

Жизнеспособность адолескариев *F. hepatica* определяли по сохранению подвижности при прогревании среды.

Жизнеспособность половозрелых и ювенильных трематод *F. hepatica* определяли по регистрации двигательной активности непосредственно после выделения гельминтов из паренхимы и протоков печени крыс.



А

Б

Рисунок 4 – Жизнеспособные (А) и нежизнеспособные (Б) личинки трихинелл (x80, оригинал)

Показатель жизнеспособности гельминтов количественно определяли как соотношение числа жизнеспособных (подвижных) особей к общему числу обследованных гельминтов и выражали в процентах (%).

Определение инвазионности

Инвазионность личинок возбудителей гельминтозов определяли путем постановки биопробы на лабораторных животных.

Для определения инвазионности личинок трихинелл ставили биопробу на лабораторных мышах (возраст 4-6 месяцев, масса 20-26 г). Доза заражения мышей составляла 100-130 личинок трихинелл на животное. Результаты учитывали на 45 день после заражения. При этом использовали методы компрессорной трихинеллоскопии и переваривания тушек мышей в искусственном желудочном соке [10]. Для проведения трихинеллоскопии отбирали пробы из жевательных мышц и/или ножек диафрагмы и изучали в компрессориуме при увеличении микроскопа x10-80.

Для определения инвазионности адолескариев *F. hepatica* использовали монгольских песчанок (возраст 5-6 месяцев, масса 80-90 г). Доза заражения животных составляла 10 адолескариев на животное. Учет результатов проводили в 2 этапа: через 14 и 90 суток после заражения лабораторных животных. Культуру

адоlesкариев считали инвазионной при регистрации миграционных путей и/или ювенильных трематод в паренхиме и протоках печени на 14 сутки и половозрелых фасциол и их яиц на 90-е сутки при проведении неполного гельминтологического вскрытия по К. И. Скрябину [78].

Спектрофотометрический метод определения концентрации гликогена

Концентрацию гликогена в гельминтах определяли адаптированным для применения в области гельминтологии специфичным спектрофотометрическим методом (патент «Способ определения гликогена в личинках трихинелл для контроля качества обезвреживания инвазионного материала»). Данный метод основан на реакции гликогена с йодом, характерным признаком которой является изменение цвета реакционной среды со светло-желтого на коричневый. Для выделения гликогена биоматериал разрушали кипячением с гидроксидом калия и осаждали этиловым спиртом с последующим центрифугированием. После нейтрализации щелочи насыщенным раствором хлорида аммония молекулы гликогена окрашивали йодом в присутствии хлорида кальция. Специфичность метода обусловлена тем, что на результаты исследования не оказывают влияние полисахариды, которые не дают окраску с йодом, но высвобождают редуцирующие сахара при гидролизе. Предел обнаружения, используемый для характеристики чувствительности фотометрических методов, составляет 3,3 мкг/мл. Для повышения точности и воспроизводимости проводили по 3 измерения оптической плотности для каждой пробы и использовали среднее значение.

Как показано в работе Данченко Е.О. и Чиркина А.А. [37], при содержании гликогена в пробе в интервале 0,01-0,4 мг имеет место прямолинейная зависимость между содержанием целевого соединения и величиной оптической плотности анализируемых растворов. Это удобно для построения градуировочного графика и более точного определения концентрации гликогена. Поэтому, содержание гликогена в указанном интервале было выбрано нами в

качестве ориентира для определения содержания исследуемого полисахарида в пробах.

Для реализации такого подхода требовалось предварительно установить необходимое для анализа количество биоматериала, в пределах которого находилось бы допустимое для обнаружения (с учетом возможных потерь в процессе пробоподготовки) и адекватной оценки содержание гликогена. При содержании гликогена $> 0,4$ мг пробы разводили рабочим раствором йодного реактива.

Содержание гликогена рассчитывали по градуировочному графику, построенному в пакете программ Microsoft Excel 2008 (Microsoft Corporation, США), для чего готовили серию стандартных растворов с известным содержанием гликогена (рис. 5) и определяли их оптическую плотность. Измерение оптического пути проводили с использованием микроколориметра медицинского фотоэлектрического МКМФ-02 в кювете с длиной оптического пути 5 мм при длине волны 425 нм против холостой пробы. При построении градуировочной кривой находили линию тренда и коэффициент аппроксимации, который считали удовлетворительным при $R^2 \geq 0,994$. Пример градуировочного графика показан на рисунке 6. Градуировочную кривую для повышения воспроизводимости периодически проверяли (не реже раза в полгода), поскольку характеристики источника возбуждения спектров и фотоэлектрического приемника могут со временем изменяться.

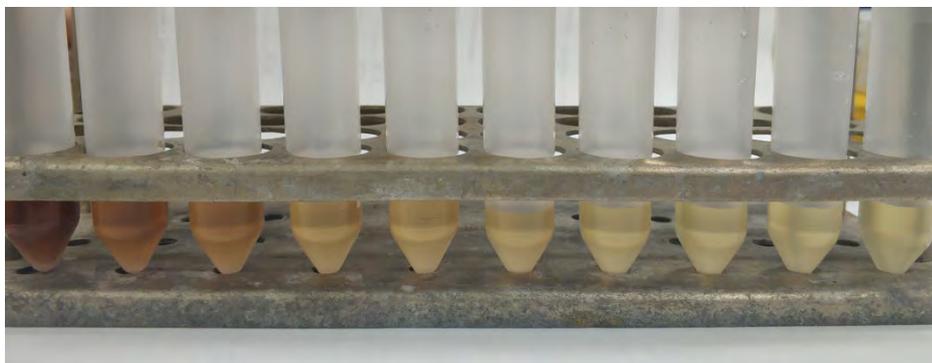


Рисунок 5 – Стандартные растворы для построения градуировочной кривой
(оригинал)

Расчет концентрации гликогена проводили по следующей формуле:

$$C = E \times k / F \times n,$$

где C — концентрация гликогена в гельминте (мг/экз.),

E — оптическая плотность анализируемой пробы (ед.),

F — фактор, который рассчитывается как тангенс угла наклона градуировочной кривой,

k — коэффициент разведения пробы,

n — количество гельминтов в пробе (экз.).

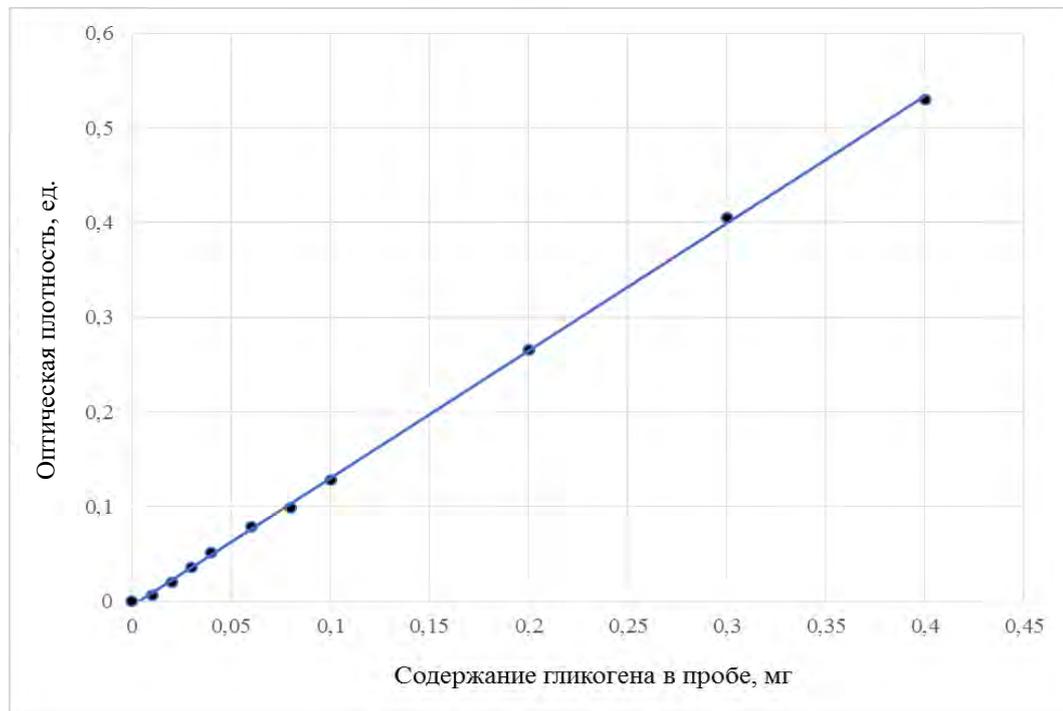


Рисунок 6 – Градуировочный график для определения концентрации гликогена

Определение количества гельминтов в пробе проводили путем подсчета в камере Мигачевой-Котельникова, повторяя операцию 3 раза и находя среднее значение [49]. Полученные данные о содержании гликогена переводили в нг/экз. или мкг/экз.

Фасциол перед проведением анализа взвешивали на аналитических весах, предварительно удалив излишки влаги фильтровальной бумагой. Концентрацию гликогена выражали в мг/мг.

Статистический анализ результатов

Статистический анализ полученных результатов проводили по методу Плохинского Н.А. [64] с использованием программы Microsoft Excel 2008. Результаты количественного анализа выражали в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Данные на графиках представляли в виде средней величины. Для оценки статистической значимости различий между исследуемыми выборками использовали t-критерий Стьюдента, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для оценки линейной зависимости между переменными рассчитывали коэффициент корреляции Пирсона (r), интерпретацию проводили по шкале Чеддока и Голубкова Е.П.

3.2. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.2.1. Отработка и адаптация спектрофотометрического метода определения концентрации гликогена в гельминтах на культуре модельной нематоды

C. elegans

Спектрофотометрический метод определения содержания гликогена в гельминтах отработывали на культуре свободноживущей модельной нематоды *Caenorhabditis elegans*. Данная модель широко используется в исследованиях метаболической регуляции и процессов старения, биологии развития, клеточной биологии, нейробиологии и генетике [90]. Относительная простота культивирования в лабораторных условиях, низкие затраты на обслуживание, возможность получения в короткие сроки достаточного объема биомассы и безопасность работы с данной культурой обуславливают выбор *C. elegans* в качестве подходящей модели для отработки спектрофотометрического метода определения гликогена в гельминтах.

Получение биомассы культуры нематод *C. elegans* для проведения эксперимента осуществляли путем культивирования на плотной питательной среде. Биомасса в этом случае включала нематод на разных этапах развития (рис. 7). Получение синхронизированной на одной стадии развития культуры нематод для определения в ней содержания гликогена возможно, но является весьма трудоемким процессом и также требует представления о необходимом для анализа количестве биоматериала, так как в доступных литературных источниках не представлено информации о концентрации гликогена в нематоде *C. elegans*, а приводятся только результаты качественных и полуколичественных исследований о содержании этого резервного полисахарида.

В целях получения необходимого объема биоматериала для исследования нематод выращивали на 24 чашках Петри (d=80 мм), содержащих ксеническую питательную среду (NGM, засеянная бактериальной культурой *E. coli*) в течение 7 суток в термостате при температуре $20\pm 1^\circ\text{C}$. По истечении указанного срока нематод смывали стерильным буфером M9 и отделяли от бактерий центрифугированием при 8000 об/мин в течение 10 мин. Биоматериал с *C. elegans*

переносили пастеровской пипеткой в 3 стерильные пробирки и помещали в ледяную баню. Проводили подсчет совокупного количества нематод на разных стадиях развития в каждой пробе при увеличении $\times 10$.



Рисунок 7 – Культура нематоды *C. elegans* на поверхности и в толще агара NGM ($\times 10$, оригинал)

Поскольку полная очистка культуры нематод, содержащей организмы на всех стадиях развития, от бактериального субстрата не представляется возможным, то дополнительно проверяли на наличие гликогена чистую культуру *E. coli*, выращенную на 8 чашках с агаром NGM, т.е. использовали для сравнения материал с заведомо большим содержанием бактерий. Пробоподготовку культуры *E. coli* для этого проводили аналогичным способом: смывали с агара стерильным буфером M9 и концентрировали центрифугированием.

Анализируемые пробы готовили для спектрофотометрического определения гликогена согласно протоколу, описанному в патенте. При обнаружении в пробах качественной реакции гликогена с йодом определяли в них концентрацию целевого вещества.

Для оптимизации процесса пробоподготовки был изменен описанный Krisman C.R. [165] и использующийся Данченко Е.О. и Чиркиным А.А. [37]

способ растворения осадка, образующегося при преципитации гликогена этиловым спиртом. Использование безынструментального способа для растворения осадка вместо перемешивания стеклянной палочкой в малом объеме среды (0,2 мл) позволило сократить потери целевого вещества в образцах, нивелировать возникающие на данном этапе погрешности и повысить воспроизводимость метода.

В пробах с чистой культурой *E. coli* качественное изменение окраски раствора не детектируется, что позволяет прийти к выводу о том, что определенное в результате экспериментов значение содержания гликогена целиком соответствует гликогену, выделенному из нематод. В 3 образцах, полученных после 7 суток культивирования *C. elegans*, содержалось от 67520 ± 2120 до 84120 ± 4060 нематод на разных стадиях развития. Среднее содержание гликогена в одной нематоде составило $1,821 \pm 0,004$ нг (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты определения содержания гликогена в исследуемых пробах *C. elegans*

№ пробы	Количество нематод в пробе, экз.	Показатель оптической плотности, ед.	Содержание гликогена в пробе, мг	Содержание гликогена в одной нематоде, нг	Среднее содержание гликогена в одной нематоде, нг
1	67520 ± 2120	0,161	0,124	1,834	$1,821 \pm 0,004$
2	75680 ± 3650	0,179	0,138	1,819	
3	84120 ± 4060	0,198	0,152	1,811	

Содержание гликогена в пробах (при тангенсе угла наклона градуировочной кривой, равном 1,3) находилось в пределах 0,01-0,4 мг, что, согласно исследованиям Данченко Е.О. и Чиркина А.А. [37], соответствует прямолинейному участку градуировочной кривой и свидетельствует о прямой пропорциональной зависимости между содержанием гликогена и величиной оптической плотности растворов. Стандартная ошибка среднего по выборке оказалась весьма малой и составила всего 0,004 нг. Учитывая, что паразитические

организмы в большинстве случаев содержат больше запасов гликогена по сравнению со свободноживущими, для определения уровня гликогена в гельминтах предполагается использование меньшего количества биомассы, в ином случае потребуются разведение анализируемых проб.

3.2.2. Изучение влияния хлорида аммония на оптическую плотность анализируемых растворов при различных температурах

Для стандартизации спектрофотометрического метода определения содержания гликогена были проведены исследования по оценке влияния температуры на результаты анализа. В ряде работ показано, что при изменении температуры наблюдаются колебания оптической плотности стандартных образцов. По нашему мнению, это может быть связано с эффектом изменения растворимости используемых солей при различных температурах, что влияет на конечный состав анализируемых проб. Учитывая вышесказанное, оценка влияния данного эффекта применительно к используемой в анализе соли, хлориду аммония, явилась целесообразной. В литературных источниках имеются сведения о влиянии другой соли, хлорида кальция, на оптическую плотность растворов при изменении температуры на 10°C в исследованном интервале [165]. В то же время влияние температуры на растворимость хлорида аммония в рамках спектрофотометрического определения содержания гликогена ранее практически не изучено.

Влияние хлорида аммония (0,2 мл на общий объем пробы 3 мл) на оптическую плотность растворов при проведении спектрофотометрического анализа исследовали при следующих температурах: 10, 15, 20, 25, 30°C. Используемые и анализируемые растворы доводили до испытываемых температур на водяной бане. Содержание гликогена в стандартных образцах составляло 0,1 мг. Результаты представлены в таблице 3.

Анализируя полученные данные, можно прийти к выводу, что в образцах без хлорида аммония оптическая плотность при повышении температур

значительно снижалась, а в присутствии данной соли, наоборот, увеличивалась, но не столь значительно.

Таблица 3 – Результаты измерения оптической плотности и расчета содержания гликогена в анализируемых растворах с известным содержанием гликогена (0,1 мг)

Хлорид аммония	Температура, °С				
	10	15	20	25	30
Оптическая плотность, ед.					
-	0,235	0,216	0,208	0,189	0,182
+	0,230	0,233	0,240	0,251	0,262
Содержание гликогена, мг					
-	0,102	0,094	0,090	0,082	0,079
+	0,100	0,101	0,104	0,109	0,114

При расчете содержания гликогена установлено, что наибольшие отклонения от известной концентрации, составляющей 0,1 мг в пробе, имеют место при температуре 25-30°С, что показано на графике (рис. 8).

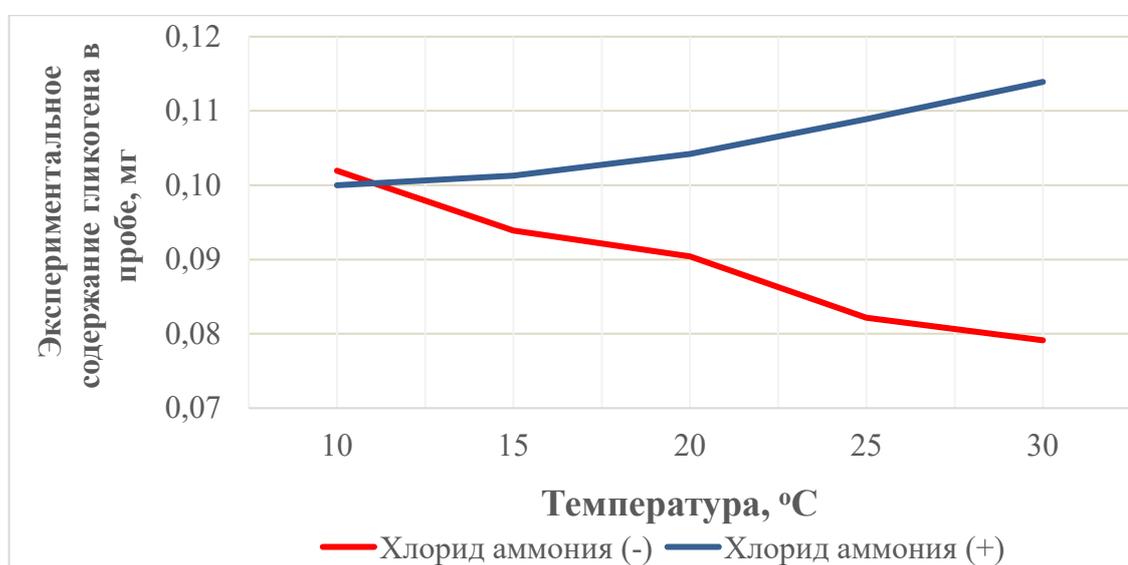


Рисунок 8 – Результаты определения содержания гликогена в пробах с известным содержанием гликогена (0,1 мг)

Вероятно, такое отклонение связано с увеличением растворимости хлорида аммония и хлорида кальция с ростом температуры. Справочные данные о

растворимости данных солей в исследуемом диапазоне температур представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Растворимость безводного хлорида кальция и хлорида аммония в воде, г/л воды [68]

Соль	Температура, °С		
	10	20	30
Хлорид кальция	650	745	1000
Хлорид аммония	333	372	414

Полученные сведения о влиянии температуры на оптическую плотность растворов без хлорида аммония оказались схожи с результатами Krisman C.R. [165], сообщающей об отклонении оптической плотности в интервале 10°С, равном 11%, в то время как в настоящем исследовании среднее отклонение в таком же интервале температур достигало 12,1% (табл. 5). В присутствии соли отклонение уменьшалось и находилось в пределах 4-8,5%.

Таблица 5 – Отклонение показателя оптической плотности анализируемых растворов в зависимости от интервала температур, выраженное в %

Хлорид аммония	Температурный интервал, °С			Среднее значение
	10-20	15-25	20-30	
-	11,3	12,5	12,5	12,1
+	4,0	7,0	8,5	6,5

Таким образом, использование хлорида аммония в составе анализируемых проб снижает влияние температуры на оптическую плотность растворов, в то время как исключение хлорида аммония из пробы приводит к более заметной разнице регистрируемой плотности.

Полученные данные свидетельствуют о том, что проведение исследований в широких диапазонах температур может привести к искажению результатов при определении концентрации гликогена спектрофотометрическим методом. В таком случае возникает необходимость стабилизации температурного режима при

анализе проб. Исключение термостатирования проб допустимо при проведении исследований в диапазоне 10-20°C, поскольку в таком интервале влияние температуры на показатель оптической плотности является минимальным.

3.2.3. Определение необходимого количества биомассы трихинелл в границах чувствительности спектрофотометрического метода

Для дальнейших исследований, объектом которых являлись паразитические нематоды рода трихинелл, требовалось установить необходимое для экспериментов количество биомассы возбудителя в границах чувствительности отработанного спектрофотометрического метода определения содержания гликогена.

Объектом для данного эксперимента служили личинки нематод *Trichinella nativa*, выделенные от трех экспериментально инвазированных крыс. Трихинелл подсчитывали и переносили в пробирки в определенном количестве, в интервале от 10^0 до 10^4 особей (верхняя граница была установлена на основании полученных результатов в предшествующем эксперименте со свободноживущей нематодой *C. elegans*) с шагом в один порядок. Затем определяли оптическую плотность проб и рассчитывали содержание гликогена в личинках. Опыт проводили в трех повторах. Результаты эксперимента представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Содержание гликогена в личинках нематоды *T. nativa*

№ опыта, п/п	Количество личинок в пробе, экз.	Среднее значение оптической плотности, ед.	Содержание гликогена в пробе, мг	Содержание гликогена в одной личинке, нг
1	1	0	-	-
2	10±1	0	-	-
3	100±2	0	-	-
4	1050±50	0,060±0,002	0,046±0,001	46,4±1,4
5	10100±150	0,598±0,016	0,460±0,009	46,0±0,9

Фиксируемое изменение окраски анализируемых растворов было выявлено только в пробах с содержанием личинок трихинелл на уровне 1050 ± 50 и 10100 ± 150 экземпляров. Показатели значения оптической плотности данных проб составили $0,060 \pm 0,002$ и $0,598 \pm 0,016$, соответственно. Гликоген в трихинеллах в пересчете на одну личинку находился в количестве около 46 нг.

Таким образом, для определения концентрации гликогена в трихинеллах следует использовать от 1000 до 10000 личинок в пробе. Поскольку в экспериментальных работах содержание гликогена в личинках может изменяться в меньшую сторону, используемое количество биомассы возбудителя должно быть таким, чтобы содержание гликогена в пробе оказалось выше пределов нижней границы достоверного интервала определения гликогена.

3.2.4. Динамика изменения концентрации гликогена в личинках *T. spiralis* на мышечной стадии развития

Данное исследование было посвящено изучению количественного содержания гликогена в личинках *T. spiralis* на мышечной стадии развития. Концентрацию гликогена в личинках трихинелл определяли, начиная с 14 суток после заражения лабораторных животных и заканчивая 20-месячным возрастом мышечных личинок. Лабораторных крыс в количестве 69 голов (масса 350 ± 20 г, возраст 5-6 месяцев) инвазировали личинками *T. spiralis* и подвергали эвтаназии (по 3 крысы) на определенные сроки после заражения. После выделения личинок трихинелл устанавливали их жизнеспособность. Для личинок 14- и 21-суточного возраста определяли инвазионность, в каждом опыте использовали по 3 мыши. Измеряли оптическую плотность подготовленных проб и вычисляли концентрацию гликогена.

Установлено, что на 14 сутки после заражения лабораторных крыс в мышечных личинках трихинелл отмечается низкий уровень гликогена, равный $2,8 \pm 1,2$ нг. Личинки данного возраста подвижны, но не инвазионны. Относительно большое отклонение в значении концентрации гликогена на 14 сутки опыта объясняется разностью во времени развития личинок в мышечной

ткани за счет продолжительности общего срока их отрождения и миграции. В дальнейшем личинки продолжают накапливать гликоген, и его концентрация в них выравнивается.

На 21 сутки гликоген в личинках регистрируется в количестве $5,4 \pm 2,7$ нг, на 28 суток – $13,6 \pm 2,4$ нг, на 45 суток – $77,1 \pm 2,5$ нг, а максимальной концентрации гликоген достигает в 4 месяца – $93,0 \pm 2,9$ нг. Затем содержание гликогена начинает медленно снижаться: $91,6 \pm 3,1$ нг в 6,5 месяцев, $87,4 \pm 2,8$ нг в 8 месяцев, $84,4 \pm 2,7$ нг в 11 месяцев, $82,9 \pm 2,8$ в 12 месяцев и $78,6 \pm 2,3$ нг в 20 месяцев (рис. 9). Начиная с 21 суток после заражения, личинки становятся инвазионными, что подтверждено результатами биопробы на лабораторных мышах. Отмечено, что с 11 месяца после инвазии в мышечной ткани образуются соли кальция на полюсах капсулы. Жизнеспособность личинок после переваривания в искусственном желудочном соке к 20 месяцам снижается на 5%, что, вероятно, связано с процессом обызвествления капсулы.

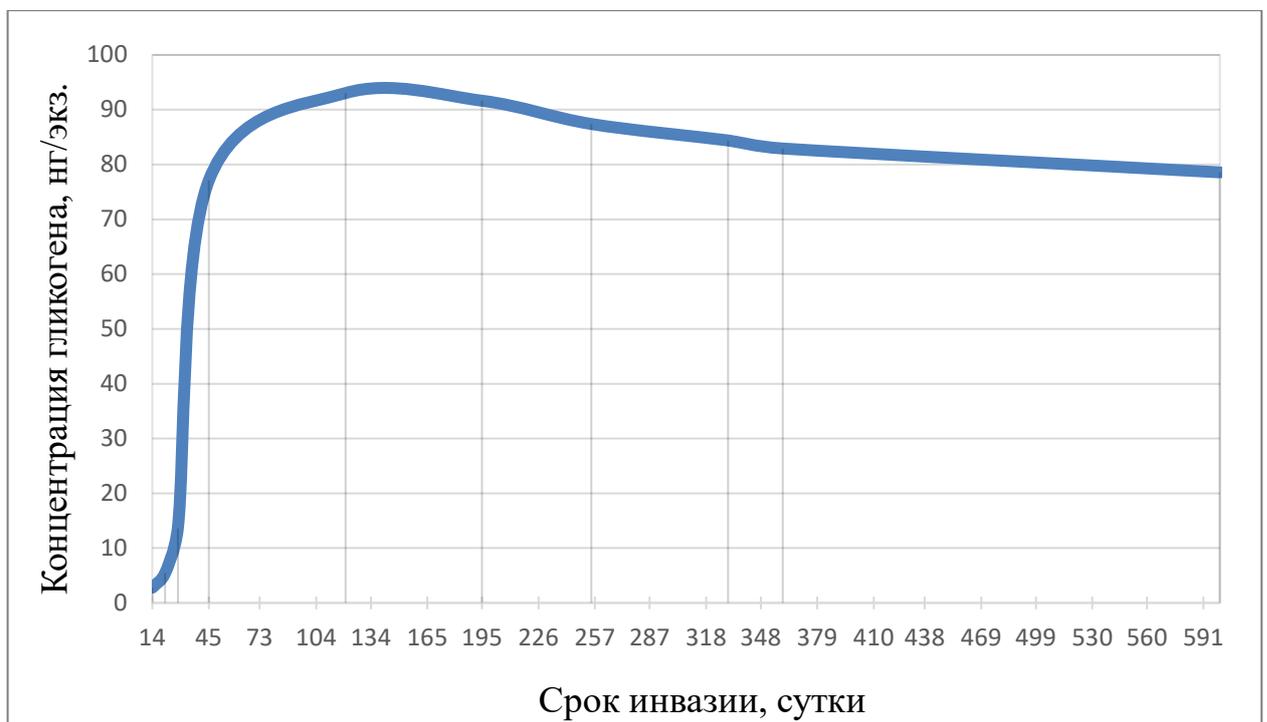


Рисунок 9 – Содержание гликогена в личинках трихинелл на мышечной стадии развития в зависимости от срока инвазии

Тот факт, что общее количество гликогена, содержащееся в личинках, увеличивается по мере роста и развития, а потом долго остается практически на одном уровне, указывает на то, что данное энергетическое соединение необходимо и на более позднем этапе, когда личинка превращается в половозрелую трихинеллу в кишечнике хозяина.

3.2.5. Содержание гликогена в трихинеллах в течение первых суток после заражения лабораторных животных

В данном исследовании было изучено содержание гликогена в трихинеллах *T. spiralis* на кишечной стадии развития в течение 24 ч после заражения лабораторных крыс. Животных не кормили в течение суток до и после заражения, что было сделано в целях нивелирования возможности, возникающей при выделении трихинелл из кишечника хозяина, попадания в пробы веществ, содержащихся в корме. Некоторые из них, в частности, полисахариды растительной природы, могут давать постороннюю качественную реакцию с йодом, сопровождающуюся изменением цвета анализируемого раствора. Например, соединение амилозы приобретает с йодом синее окрашивание, а амилопектина – красновато-фиолетовое [58].

Нематод для эксперимента выделяли из тонкого кишечника крыс через 3; 6 и 24 ч после заражения и определяли в них содержание гликогена. Для установления начального количества гликогена в трихинеллах также определяли концентрацию исследуемого вещества в мышечных личинках трихинелл, которых использовали для заражения животных.

По результатам эксперимента концентрация гликогена в мышечных личинках трихинелл составила $90 \pm 1,8$ нг. Через 3 ч после заражения крыс уровень гликогена в трихинеллах понизился до $47,2 \pm 0,3$ нг. Спустя 6 ч содержание данного вещества достигло значения $27,2 \pm 0,2$ нг. У трихинелл, находившихся в тонком кишечнике крыс в течение суток, гликоген не детектировался (рис. 10), что объясняется крайне низким его содержанием у гельминтов в данный период, находящемся ниже предела чувствительности метода.

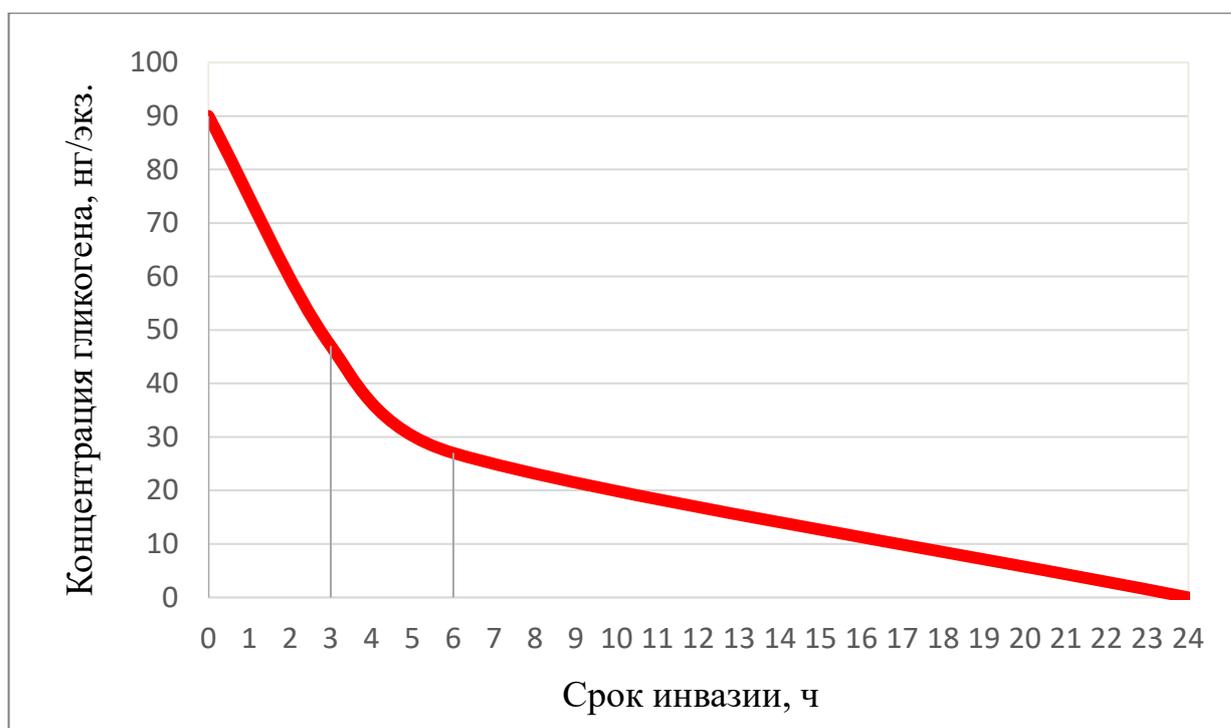


Рисунок 10 – Содержание гликогена в трихинеллах в течение 24 ч после заражения

Быстрое расходование запасенного на мышечной стадии развития гликогена у трихинелл в кишечнике «голодных» крыс свидетельствует о высокой интенсивности потребления глюкозы для энергетических и пластических потребностей. Синтез гликогена в первые сутки после инвазии, если таковой происходит, не может компенсировать затрат, что объясняется, прежде всего, недостаточным поступлением экзогенных питательных веществ.

3.2.6. Динамика содержания гликогена, жизнеспособность и инвазионность личинок трихинелл *T. nativa* и *T. pseudospiralis* в естественных условиях в зимне-весенний период в Центральном регионе России

Для проведения исследования лабораторных крыс в количестве 27 голов (масса 320 ± 10 г, возраст 4-5 месяцев) заражали личинками *T. nativa* (15 крыс) и *T. pseudospiralis* (12 крыс). По 3 крысы из каждой группы служили контролем (К). Через 9 месяцев после заражения (в декабре) животных подвергали эвтаназии. Контрольные группы исследовали на жизнеспособность личинок трихинелл и

концентрацию в них гликогена. Цельные тушки опытных крыс, изолированных друг от друга, закладывали в пластиковые контейнеры под снежный покров на территории охотничьего хозяйства Рязанской области. Для длительного сохранения тушек животных на место хранения вносили дополнительное количество снега. Во время проведения исследования температурный режим окружающей среды находился в пределах от $-8,4^{\circ}\text{C}$ в январе до $+11,5^{\circ}\text{C}$ в мае (табл. 7). Под снежным покровом, где хранились тушки экспериментально зараженных животных, температура была постоянной и составляла $3-4^{\circ}\text{C}$. Ежемесячно, с января по май, из места хранения последовательно извлекали по 3 тушки животных из обеих опытных групп, выделяли личинок трихинелл, определяли их жизнеспособность и содержание гликогена. Инвазионность личинок трихинелл определяли в последний месяц исследований, в каждом опыте использовали по 3 животных.

Таблица 7 – Температурный режим окружающей среды во время проведения исследований в Шилово Рязанской области за 2017 год (Архивные данные ГИДРОМЕТЦЕНТРА России)

Месяц	Средние показатели за месяц	
	Температура воздуха, $^{\circ}\text{C}$	Влажность воздуха, %
Январь	-8,4	89
Февраль	-6,1	90
Март	+1,4	90
Апрель	+6,5	75
Май	+11,5	67

Исследование проб мышечных личинок *T. nativa* проводили в течение 103 суток, с января по апрель включительно (в марте и мае исследований не проводили, так как выделенное количество личинок возбудителя *T. nativa* было недостаточным для проведения анализа). На протяжении данного периода жизнеспособность личинок гельминтов сохранялась на высоком уровне: 99,5-100% (табл. 8). Однако по результатам биопробы оказалось зараженным только одно из трех животных.

Таблица 8 – Жизнеспособность и инвазионность мышечных личинок *T. nativa* в тушках лабораторных крыс

Показатели в пробе	Период наблюдения, сутки			
	декабрь (К)	январь (1)	февраль (2)	апрель (3) *
Всего, экз.	189±8	163±10	193±5	191±7
Жизнеспособных, экз.	189±8	163±10	192±4	190±6
Жизнеспособных, %	100	100	99,5±0,5	99,5±0,5
Примечание: * - инвазионность личинок 33%				

В период с февраля по май также была исследована жизнеспособность мышечных личинок *T. pseudospiralis*, срок изучения составил 154 дня. В течение первых 3 месяцев данный показатель сохранялся в пределах 99,3-100%, в апреле несколько изменился: составил 85,7%. В мае жизнеспособность личинок *T. pseudospiralis* значительно снизилась и достигла значения 54,7% (табл. 9). Личинки оказались неинвазионными в последний месяц исследований, что совпадает со снижением уровня жизнеспособности.

Таблица 9 – Жизнеспособность и инвазионность мышечных личинок *T. pseudospiralis* в тушках белых крыс

Показатели в пробе	Период наблюдения, сутки				
	декабрь (К)	февраль (1)	март (2)	апрель (3)	май (4) *
Всего, экз.	186±7	179±9	203±10	172±8	49±5
Жизнеспособных, экз.	186±7	178±9	202±10	147±4	27±5
Жизнеспособных, %	100	99,3±0,4	99,3±0,4	85,7±1,6	54,7±5,8
Примечание: * - инвазионность личинок 0%					

Подсчет личинок трихинелл перед определением в них содержания гликогена для упрощения и удобства осуществляли в каплях. Обобщая полученные данные (опыты: К, 1, 2, 3), можно заключить, что среднее количество личинок *T. nativa* в 1 капле находилось в пределах 6520-7733 экз., личинок *T. pseudospiralis* – в пределах 6920-8120 экз., что объясняется разными линейными размерами гельминтов. В четвертом опыте, проведенном в мае, число личинок

T. pseudospiralis оказалось минимальным и составило в среднем 1973 ± 208 личинки в капле. Следует отметить, что в конце срока хранения биологического материала в естественных условиях количество личинок *T. pseudospiralis* в тушках крыс было минимальным. По всей видимости, это может быть связано с меньшей интенсивностью инвазии подопытных животных и влиянием процессов гниения и разложения в тушках, чему способствовало повышение среднемесячной температуры воздуха в мае до $11,5^\circ\text{C}$ (по сравнению со среднемесячной температурой в январе, равной минус $8,4^\circ\text{C}$). Последним фактором также объясняется наименьшее за весь период исследования число личинок в пробах: после переваривания костно-мышечного фарша в ИЖС, на дне, помимо личинок, оказалось множество мелких тканевых фрагментов (условия проведения опыта, в частности, время экспозиции и температура ИЖС, оставались неизменными). Результаты эксперимента представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты определения содержания гликогена в личинках трихинелл

№ опыта, п/п	Среднее количество личинок в капле, экз.	Количество капель в одной пробе, ед.		Среднее содержание гликогена в одной личинке, нг
<i>Личинки трихинелл вида T. nativa</i>				
К	6930 ± 380	1		$45,7 \pm 3,1$
1	6520 ± 400	1		$41,3 \pm 1,4$
2	7733 ± 190	1		$32,7 \pm 0,8$
3	7653 ± 260	1	2	$14,8 \pm 1,0$
<i>Личинки трихинелл вида T. pseudospiralis</i>				
К	7528 ± 380	1		$32,7 \pm 0,6$
1	7160 ± 370	1		$20,3 \pm 0,3$
2	8120 ± 410	1		$11,5 \pm 0,2$
3	6920 ± 330	1	2	$3,2 \pm 0,3$
4	1973 ± 210	8		$2,3 \pm 0,3$

Анализируя приведенные выше данные, можно отметить, что концентрация гликогена последовательно уменьшается в личинках трихинелл обоих видов с течением времени: с $45,7 \pm 3,1$ нг до $14,8 \pm 1,0$ нг в личинках *T. nativa* и с $32,7 \pm 0,6$ нг до $2,3 \pm 0,3$ нг в личинках *T. pseudospiralis*.

В последние два месяца содержание гликогена в личинках *T. pseudospiralis* отличается мало. Учитывая, что численность нежизнеспособных личинок *T. pseudospiralis* в этот период значительно увеличивается, можно предположить, что запасы гликогена приближаются к минимальному уровню, способному обеспечить жизнеспособность исследуемых организмов, или же условия их среды обитания становятся настолько агрессивными, что внутриклеточные и внутриорганизменные системы поддержания жизнеспособности трихинелл не справляются, и личинки погибают, что также отражается на уровне инвазионности.

В одних временных границах эксперимента концентрация гликогена существенно отличается между двумя видами трихинелл. Например, в феврале в личинках *T. nativa* содержится 32,7 нг гликогена, а в личинках *T. pseudospiralis* – 20,3 нг, в апреле – 14,8 и 3,2 нг, соответственно. Интересно отметить, что такое различие в содержании данного полисахарида между двумя видами трихинелл, составляющее около 12,0 нг/экз., сохраняется на протяжении всего эксперимента, что хорошо видно на рисунке 11. Из анализа данных следует, что динамика содержания гликогена в личинках трихинелл двух разных видов, *T. nativa* и *T. pseudospiralis*, во время хранения биологического материала в естественных условиях в зимне-весенний период сопоставима между собой. Это подтверждает факт наличия общих механизмов сохранения возбудителя трихинеллеза в природе.

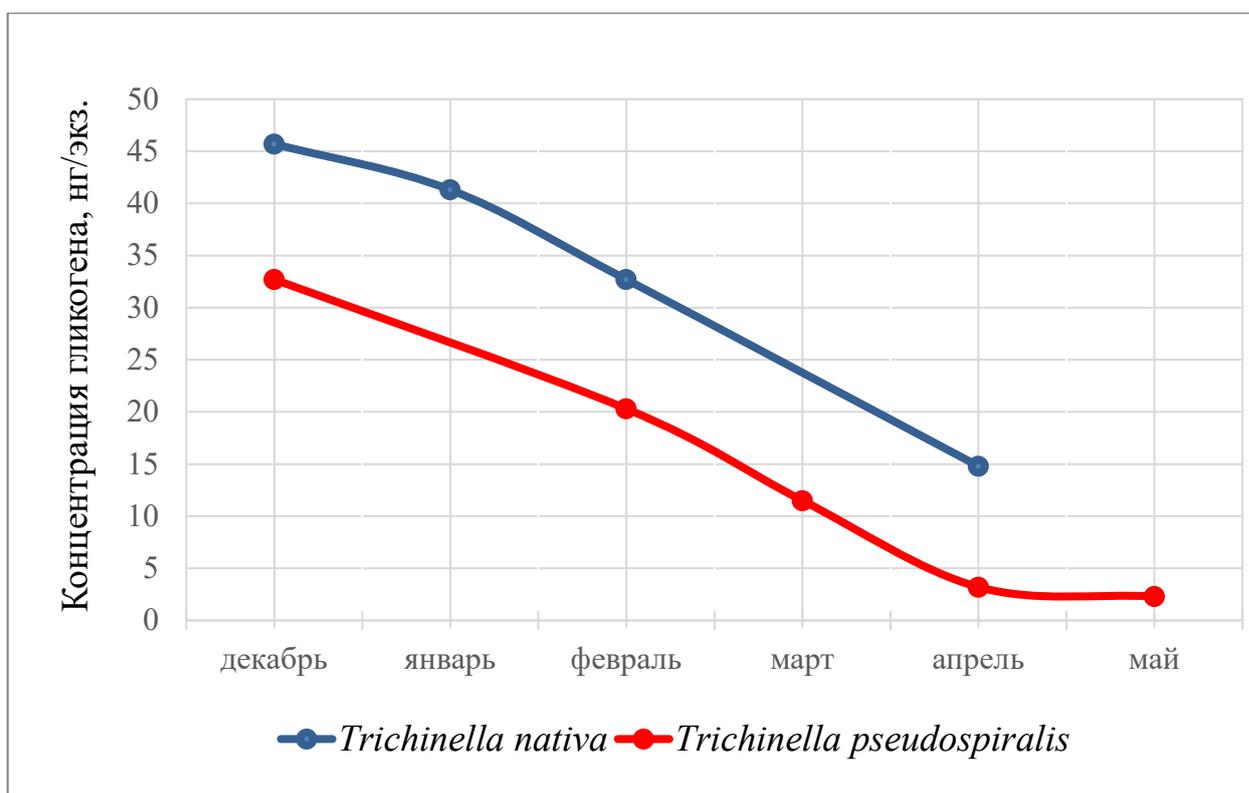


Рисунок 11 – Динамика содержания гликогена в мышечных личинках трихинелл при хранении биологического материала в естественных условиях (зима-весна)

3.2.7. Влияние положительной температуры на содержание гликогена и жизнеспособность личинок трихинелл

В целях исследования влияния положительной температуры на содержание гликогена в трихинеллах использовали личинок нематод вида *T. nativa*. Биоматериал, выделенный от 3 зараженных крыс, помещали в пробирки с физиологическим раствором и хранили в термостате при $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Каждые сутки при увеличении $\times 10$ визуально оценивали жизнеспособность личинок. Содержание гликогена в трихинеллах определяли в начале и в конце эксперимента.

Результаты экспериментов показывают, что концентрация гликогена в личинках *T. nativa* при инкубировании в физиологическом растворе при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ снижалась вместе с показателем жизнеспособности. В начале эксперимента в свежесделанных капсулообразующих личинках трихинелл количество

гликогена (жизнеспособность 100%) составило, в среднем, 42 ± 4 нг в пересчете на одну личинку. На третьи сутки, когда личинки полностью утратили двигательную активность (жизнеспособность 0%), уровень гликогена упал до 7 ± 2 нг/экз. Можно полагать, что такое значение является критичным для сохранения жизнеспособности личинок *T. nativa*.

Под действием положительной температуры свежесыведенные личинки трихинелл проявляют подвижность, и мобилизация энергетических ресурсов, в первую очередь гликогена, для обеспечения поддержания жизнеспособности и двигательной активности продолжается до тех пор, пока запасы источников энергии не снизятся до критического уровня и/или количество накопленных повреждений не превысит допустимого. В проведенном исследовании данный процесс протекал в течение трех суток.

3.2.8. Динамика содержания гликогена, инвазионности и жизнеспособности адолескариев *F. hepatica* при различных температурах

В настоящем исследовании определяли динамику содержания гликогена с одновременной оценкой характеристик биологических свойств, жизнеспособности и инвазионности, культуры адолескариев *F. hepatica* в процессе хранения при различных температурах. Хранение биоматериала проводили в дистиллированной воде при $-2 \pm 2^\circ\text{C}$, $6 \pm 2^\circ\text{C}$ и $38 \pm 2^\circ\text{C}$. Для постановки биопробы использовали 42 монгольские песчанки (в каждом опыте по 3 животных). При отсутствии жизнеспособных адолескариев в опытном образце дальнейшие исследования не проводили.

Содержание гликогена в адолескариях *F. hepatica* в начале эксперимента (жизнеспособность 100%) составляло в среднем $0,120 \pm 0,002$ мкг/экз. В процессе хранения опытного материала уровень гликогена и показатели жизнеспособности и инвазионности личинок снижались с зависимой от температуры скоростью. Результаты исследования представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Биологические свойства и содержание гликогена в адолескариях
F. hepatica

Время хранения	Биологические свойства			Среднее количество адолескариев в пробе, экз.	Содержание гликогена, мкг/экз.
	Жизнеспособность, %	Инвазионность			
		14 суток после инвазии	90 суток после инвазии		
-2±2°C					
48 сут.	92,5±3,2	+++	+++	1100±50	0,112±0,002
72 сут.	87,2±5,0	++-	++-	1200±50	0,092±0,004
6±2°C					
1 мес.	93,2±1,8	+++	+++	1050±250	0,115±0,001
7 мес.	71,8±3,5	+++	+++	680±130	0,103±0,002
13 мес.	6,5±1,6	+++	+-	840±40	0,061±0,002
38±2°C					
1 сут.	91,5±2,4	+++	+++	1000±20	0,109±0,003
2 сут.	13,2±4,3	+++	+-	1100±50	0,081±0,003
Примечание: «+» – положительная биопроба, «-» – отрицательная биопроба					

Коэффициент корреляции между содержанием гликогена и показателем жизнеспособности адолескариев фасциолы под действием различных температур составил 0,91, что по шкале Чеддока и Е.П. Голубкова интерпретируется, соответственно, как «весьма высокая» и «сильная» положительная линейная зависимость между переменными.

Установлено, что при температуре 6±2°C жизнеспособность, инвазионность и содержание гликогена в адолескариях фасциолы сохранялись на высоком уровне в течение длительного времени. На протяжении 7 месяцев исследуемые показатели, в целом, не претерпевали значимых изменений. Так, жизнеспособность адолескариев в данный период оказалась равной 71,8%, инвазионность – 100%, концентрация гликогена – 0,103±0,002 мкг/экз. При проведении гельминтологического вскрытия на 14-е сутки зарегистрированы миграционные пути и геморрагии на поверхности печени песчанок, от всех животных данной группы выделены ювенильные фасциолы. На 90-е сутки после

инвазии были обнаружены половозрелые фасциолы и их яйца. Через 13 месяцев после заражения жизнеспособность адолескариев фасциолы снизилась до 6,5%, концентрация гликогена – до $0,061 \pm 0,002$ мкг/экз. По результатам биопробы на 14-е сутки были зарегистрированы миграционные пути на поверхности печени, ювенильные формы возбудителя не выявлены. На 90-е сутки половозрелые фасциолы с яйцами были обнаружены только у одного из трех животных. Жизнеспособных адолескариев спустя 15 месяцев в заданных условиях хранения не детектировалось.

Наиболее выраженное влияние на изучаемые характеристики адолескариев *F. hepatica* отмечалось при воздействии температуры $38 \pm 2^\circ\text{C}$. Спустя трое суток хранения жизнеспособных особей уже не выявлялось. В период между первыми и вторыми сутками жизнеспособность снизилась с 91,5 до 13,2%, концентрация гликогена – с $0,109 \pm 0,003$ до $0,081 \pm 0,003$ мкг/экз. Если на 1-е сутки хранения инвазионность культуры во всех опытах составляла 100%, то на 2-е сутки хранения по результатам неполного гельминтологического вскрытия половозрелые фасциолы с яйцами детектировались только у одного животного (инвазионность 33%).

При температуре хранения, составляющей $-2 \pm 2^\circ\text{C}$, через 48 суток жизнеспособность адолескариев составляла 92,5%, инвазионность – 100%, концентрация гликогена – $0,112 \pm 0,002$ мкг/экз. На 72-е сутки показатели жизнеспособности и содержания гликогена опустились до 87,2% и $0,092 \pm 0,004$ мкг/экз., соответственно. По результатам биопробы на 14-е и 90-е сутки заразилось два животных из трех (инвазионность 66,7%). Через 96 суток хранения адолескарии полностью утратили двигательную активность.

Таким образом, исходя из полученных данных, наиболее благоприятные условия для сохранения возбудителя обеспечиваются при температуре окружающей среды около $+6^\circ\text{C}$. Более высокие температуры ($38 \pm 2^\circ\text{C}$), в отличие от низких ($-2 \pm 2^\circ\text{C}$), оказывают губительное действие на адолескариев фасциол в течение относительно короткого периода времени: показатели жизнеспособности,

инвазионности и концентрация гликогена значительно снижаются уже на 2-е сутки хранения.

3.2.9. Отработка спектрофотометрического метода определения концентрации гликогена в фасциолах. Сравнение содержания гликогена в свежевыделенном и подвергнутом недолговременной заморозке материале

Целью данного исследования являлась отработка методики определения гликогена в трематодах *F. hepatica* и изучение вопроса о влиянии недолговременного замораживания биоматериала на детектирование изучаемого полисахарида в пробах. Проведение такой работы было необходимым этапом для планирования экспериментов, в которых в качестве объектов изучения использовали половозрелых и неполовозрелых фасциол.

Для отработки метода использовали фасциол, выделенных от 3 инвазированных адолескариями крыс после 4 месяцев инвазии. Трематод делили на 2 равные группы, по 5 экземпляров в каждой. Содержание гликогена определяли в первой группе непосредственно сразу после выделения фасциол, во второй – после 3 суток хранения в морозильной камере при -20°C и последующем оттаивании. Масса трематод в группе свежевыделенных фасциол в среднем составляла $115,6 \pm 9,6$ мг, в замороженных фасциолах – $132,9 \pm 14,5$ мг. Концентрацию гликогена определяли в каждой трематоде индивидуально. Вследствие высокого содержания гликогена использовали метод разведения. Пробы разводили таким образом, чтобы наблюдаемый аналитический эффект приходился на прямолинейный участок калибровочной кривой, т.е. значения оптической плотности растворов находились в диапазоне 0,1-0,4, что соответствует (при тангенсе угла наклона, равном 2,2) 0,045-0,182 мг гликогена в пробе. Для анализа содержания вещества использовали по 3 значения оптической плотности. Результаты представлены в таблицах 12 и 13.

Таблица 12 - Результаты определения содержания гликогена в свежесыведенных фасциолах (1 группа)

№ опыта, п/п	Масса фасциолы, мг	Показатель оптической плотности, ед.	Содержание гликогена в фасциоле, мг	Среднее содержание гликогена в фасциоле, мг	Содержание гликогена в фасциоле, мг/мг	Среднее содержание гликогена в фасциоле, мг/мг
1	140,2	0,273	6,08	6,18±0,06	0,0434	0,0441±0,0005
		0,218	6,24		0,0445	
		0,178	6,23		0,0444	
2	126,5	0,312	4,96	5,05±0,12	0,0392	0,0399±0,0009
		0,222	4,94		0,0391	
		0,183	5,24		0,0414	
3	89,1	0,3	3,82	3,88±0,06	0,0429	0,0436±0,0006
		0,202	3,86		0,0433	
		0,156	3,97		0,0446	
4	112,7	0,319	5,08	5,09±0,08	0,0450	0,0453±0,0007
		0,224	4,99		0,0443	
		0,182	5,21		0,0462	
5	109,5	0,315	5,01	5,04±0,08	0,0458	0,0460±0,0007
		0,222	4,94		0,0452	
		0,18	5,15		0,0471	
Среднее содержание гликогена в группе: 0,0438±0,0012 мг/мг						

Таблица 13 - Результаты определения содержания гликогена в замороженных фасциолах (2 группа)

№ опыта, п/п	Масса фасциолы, мг	Показатель оптической плотности, ед.	Содержание гликогена в фасциоле, мг	Среднее содержание гликогена в фасциоле, мг	Содержание гликогена в фасциоле, мг/мг	Среднее содержание гликогена в фасциоле, мг/мг
1	131,3	0,223	5,68	5,78±0,06	0,0432	0,0440±0,0005
		0,183	5,82		0,0443	
		0,153	5,84		0,0445	
2	145,6	0,2	6,36	6,49±0,08	0,0437	0,0446±0,0006
		0,148	6,59		0,0453	
		0,128	6,52		0,0448	
3	128,1	0,234	5,96	5,98±0,03	0,0465	0,0467±0,0003
		0,187	5,95		0,0464	
		0,158	6,03		0,0471	
4	169,7	0,272	6,92	7,08±0,10	0,0408	0,0417±0,0006
		0,186	7,10		0,0418	
		0,126	7,22		0,0425	
5	90	0,354	3,38	3,48±0,06	0,0375	0,0387±0,0007
		0,276	3,51		0,0390	
		0,186	3,55		0,0395	
Среднее содержание гликогена в группе: 0,0431±0,0015 мг/мг						

Исходя из полученных данных, можно заключить, что фасциолы накапливают гликоген по мере увеличения массы в процессе роста и развития. Так, в некрупных экземплярах (89,1-90 мг) гликоген содержался в количестве 3,48-3,88 мг, в то время как в трематодах массой 140,2-169,7 мг его абсолютный уровень поднимался до 6,18-7,08 мг. Необходимо отметить, что при этом относительное содержание запасного полисахарида в трематодах, составляющее 4%, на данном этапе развития остается постоянным.

Среднее содержание гликогена в первой группе составило $0,0438 \pm 0,0012$ мг/мг, во второй – $0,0431 \pm 0,0015$ мг/мг. Достоверных различий между выборками не выявлено ($p > 0,05$), что позволяет прийти к выводу о возможности недолговременного замораживания образцов для исследований.

Проанализировано влияние разведения проб на отклонение получаемых значений оптической плотности. Среднее отклонение стандартной ошибки среднего содержания гликогена в фасциоле по выборкам для первой группы равнялось 0,0007, для второй – 0,0005, что меньше, чем таковое значение для среднего содержания гликогена по группам: 0,0012 и 0,0015, соответственно. Следовательно, разведение проб в достоверном интервале определения концентрации гликогена не оказывает большего влияния, чем разница между содержанием гликогена в трематодах одного возраста, что позволяет использовать спектрофотометрический метод для определения данного вещества в фасциолах без ограничений.

3.2.10. Определение содержания гликогена в трематодах *F. hepatica* на преимагинальной стадии развития после однократного введения крысам антигельминтиков из группы бензимидазолов

Учитывая ключевую роль гликогена в биологическом цикле фасциолы, а также актуальность вызываемого ею заболевания, полагали целесообразным оценить влияние антигельминтных препаратов на данный показатель на примере указанного возбудителя.

Влияние антигельминтиков на содержание гликогена в трематодах *F. hepatica* исследовали на примере действия препаратов из группы бензимидазолов, альбендазола (АБ) и триклабендазола (ТКБ), на преимагинальных фасциол.

Для препаратов данной группы характерны слабая растворимость и низкая всасываемость в пищеварительной системе. Поэтому для преодоления этих факторов в настоящее время разработаны супрамолекулярные комплексы на основе действующего вещества и водорастворимого полимера, которые повышают антигельминтную и экономическую эффективность и более безопасны в использовании [4]. На основании копроовоскопических исследований авторы оценивают повышение антигельминтной эффективности супрамолекулярного комплекса триклабендазола с поливинилпирролидоном (ПВП) не менее, чем в 5 раз по сравнению с субстанцией триклабендазола [50, 51], поэтому для сравнения было решено использовать данный препарат в 5 раз меньшей дозе по действующему веществу.

В качестве лабораторной модели фасциолеза использовали белых крыс линии Вистар (масса 320 ± 10 г, возраст 4-5 месяцев), которых инвазировали в дозе 20 адолескариев *F. hepatica* на животное. Всего в эксперименте использовали 20 крыс, которые были распределены на контрольную (2 животных) и три опытные (по 6 животных в каждой) группы. Препараты вводили в дозах, рекомендуемых производителями для неполовозрелых фасциол. На 40-ые сутки после заражения первой опытной группе перорально вводили супрамолекулярный комплекс ТКБ с ПВП в дозе по действующему веществу 1 мг/кг, второй группе – ТКБ в дозе 5 мг/кг, третьей – АБ в дозе 15 мг/кг. Животные из контрольной группы препаратов не получали. Через сутки, двое и трое суток по 2 животных из каждой группы подвергали эвтаназии. От каждой крысы были выделены трематоды в количестве 2-8 экземпляров, масса которых в среднем составляла $4,7 \pm 1,0$ мг. В пробирки помещали по 2-3 трематоды и проводили измерения концентрации в них гликогена.

В контрольной группе гликоген содержался в количестве $0,041 \pm 0,002$ мг/мг фасциолы. Концентрация гликогена в трематодах через сутки после лечения

АБ составила $0,032 \pm 0,005$ мг/мг, к третьему дню ее значение пришло к исходному для фасциол данной группы (табл. 14). Через сутки после введения крысам препаратов, содержащих ТКБ, наблюдали значительное снижение уровня гликогена в гельминтах: до $0,027 \pm 0,002$ мг/мг после введения ТКБ и до $0,025 \pm 0,002$ мг/мг после введения ТКБ в комплексе с ПВП. На вторые сутки после терапии ТКБ-содержащими препаратами количество гликогена в фасциолах повысилось, а на третьи – приблизилось к исходному.

Таблица 14 – Содержание гликогена в преимагинальных *F. hepatica* (мг/мг) после лечения крыс антигельминтиками

Время после терапии, сутки	ТКБ	ТКБ+ПВП	АБ
1	$0,027 \pm 0,002^*$	$0,025 \pm 0,002^*$	$0,032 \pm 0,005$
2	$0,032 \pm 0,007$	$0,033 \pm 0,006$	$0,038 \pm 0,006$
3	$0,039 \pm 0,006$	$0,038 \pm 0,007$	$0,042 \pm 0,004$
Примечание: * – Снижение концентрации гликогена в группе статистически значимо по сравнению с контролем ($P < 0,05$).			

Обобщая полученные данные, можно заключить, что концентрация гликогена в преимагинальных фасциолах после терапии препаратами, производными бензимидазолов, снижается (или имеет тенденцию к снижению для АБ) в течение первых суток. В последующие сроки наблюдается постепенное восстановление резервов исследуемого полисахарида до исходного уровня. В отличие от препаратов с ТКБ, достоверного влияния АБ на содержание гликогена в преимагинальных фасциолах не выявлено. Значимых различий в содержании гликогена после терапии ТКБ в используемых дозах в виде субстанции и в виде комплекса с водорастворимым полимером в изучаемые сроки не зафиксировано, что указывает на схожесть протекаемых процессов метаболизма гликогена.

3.2.11. Определение содержания гликогена в имагинальных фасциолах после многократного введения крысам препаратов, производных бензимидазолов

Для изучения влияния антигельминтиков группы бензимидазолов на содержание гликогена в имагинальных фасциолах использовали схему терапии, направленную на более длительное сохранение метаболитов действующих веществ лекарственных препаратов в организме крыс.

Лабораторных крыс (масса 320 ± 10 г, возраст 4-5 месяцев) инвазировали в дозе 20 адолескариев *F. hepatica* на животное. Всего было использовано 30 крыс, которых распределили на контрольную (6 животных) и две опытные (по 12 животных в каждой) группы. Через 8 месяцев после заражения крысам вводили терапевтические препараты в дозах, рекомендуемых производителями для половозрелых фасциол. Первой опытной группе вводили АБ в дозе по действующему веществу 15 мг/кг, а второй – супрамолекулярный комплекс ТКБ с ПВП в дозе по действующему веществу 2 мг/кг. Терапию зараженных крыс проводили в заданные промежутки времени по следующей схеме: 0, 6, 24, 30, 48 ч. Животные контрольной группы антигельминтных препаратов не получали. Опытных крыс подвергали эвтаназии (по 2 животных) через 6, 24, 30, 48, 54 и 240 ч после первого получения препарата. Контрольных крыс (так же по 2 животных) подвергали эвтаназии на 0 ч, 48 ч и 240 ч от начала эксперимента. При выделении фасциол отмечали их жизнеспособность. От каждой крысы были получены трематоды в количестве 1-7 экземпляров, вес которых в среднем составлял $134,3 \pm 4,3$ мг. Концентрацию гликогена определяли в каждой фасциоле отдельно.

При выделении фасциол у всех особей была установлена подвижность, что указывает на сохранение их жизнеспособности после терапии антигельминтиками. Начальное содержание гликогена в фасциолах составляло $0,045 \pm 0,001$ мг/мг. Через 6 ч после введения крысам препаратов наблюдали следующее снижение уровня гликогена в гельминтах: до $0,033 \pm 0,004$ мг/мг после введения ТКБ и до $0,038 \pm 0,003$ мг/мг после введения АБ. Через 24 ч концентрация гликогена в трематодах опустилась до $0,022 \pm 0,005$ мг/мг (ТКБ) и до $0,027 \pm 0,005$ мг/мг (АБ). На 30 ч эксперимента значение исследуемого полисахарида несколько

повысилась: до $0,027 \pm 0,005$ мг/мг (ТКБ) и до $0,032 \pm 0,006$ мг/мг (АБ), а затем, на вторые сутки после терапии, снова опустилось: до $0,019 \pm 0,003$ мг/мг (ТКБ) и до $0,021 \pm 0,004$ мг/мг (АБ). На 54 ч опыта концентрация гликогена увеличилась до $0,022 \pm 0,004$ мг/мг (ТКБ) и до $0,027 \pm 0,002$ мг/мг (АБ). На 10-е сутки после терапии содержание гликогена в фасциолах значительно повысилось и составило $0,038 \pm 0,006$ мг/мг (ТКБ) и $0,042 \pm 0,006$ мг/мг (АБ) (рис. 12).

Снижение уровня гликогена в фасциолах после терапии крыс является достоверным ($P < 0,05$), в то время как значимых отличий между двумя группами, получавшими разные антигельминтики, обнаружено не было ($P > 0,05$).

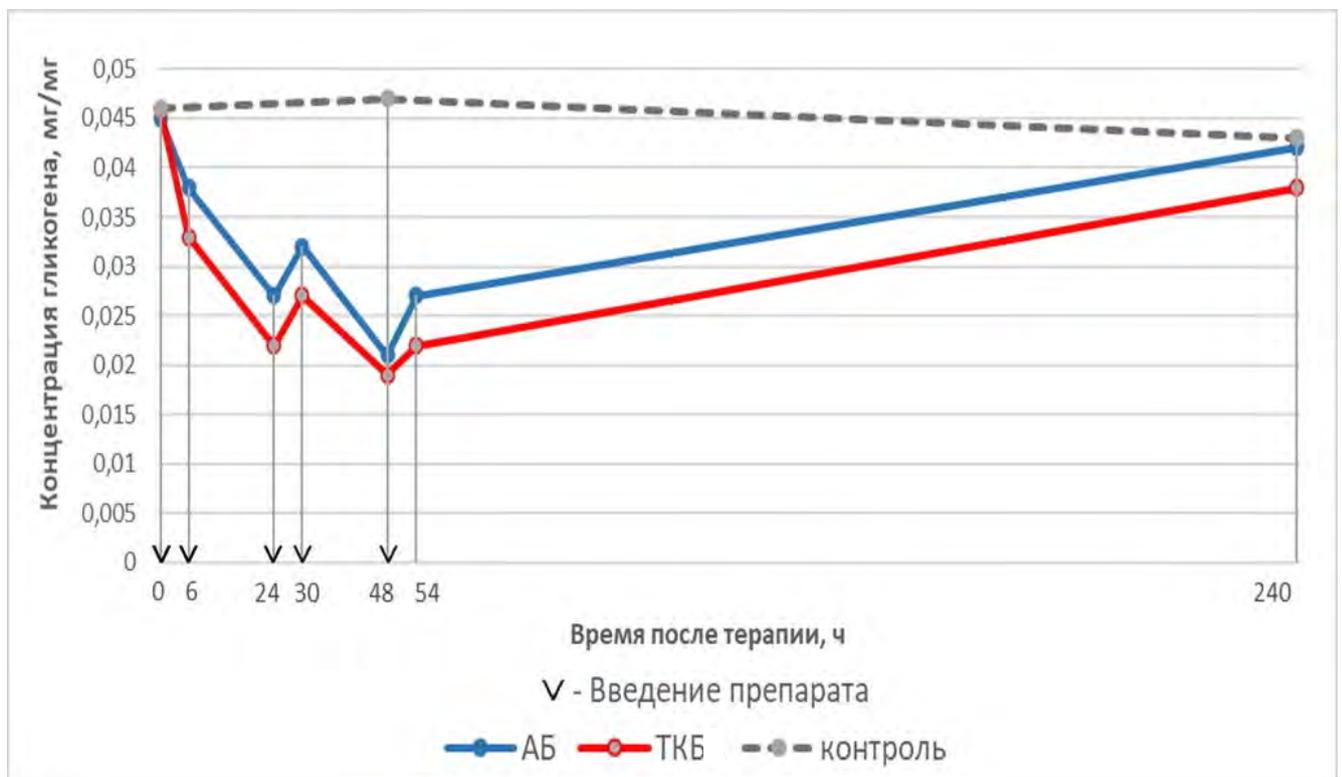


Рисунок 12 – Содержание гликогена (мг/мг) в имагинальных *F. hepatica* после лечения крыс антигельминтиками

В настоящем исследовании наблюдается соотношение процессов синтеза и распада гликогена, смещаемое в ту или иную сторону в зависимости от силы воздействия химиопрепаратов и метаболической реактивности тестируемых объектов. Наименьшее содержание гликогена в трематодах отмечается на 24 и 48 ч эксперимента. Повторный прием антигельминтиков обеспечил более

существенное воздействие на углеводный и энергетический метаболизм фасциол, что определяется самым низким содержанием гликогена за время эксперимента. После прекращения терапии содержание гликогена в фасциолах возрастает в интервале 54-240 ч. Также стоит отметить схожесть влияния на концентрацию гликогена в имагинальных фасциолах АБ и ТКБ в супрамолекулярном комплексе с ПВП, что хорошо видно на графике.

3.3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований была доработана и адаптирована к паразитарным объектам методика спектрофотометрического определения гликогена – одного из ключевых компонентов энергетического метаболизма гельминтов.

Оптимизация методики, в частности, изменение способа растворения осадка в анализируемых образцах, позволила сократить потери целевого вещества в процессе пробоподготовки. Также в целях минимизации систематических и случайных погрешностей были охарактеризованы отклонения показателей оптической плотности, возникающие при значительном изменении температуры при проведении исследований, что в целом характерно для спектрофотометрических методов анализа и следует учитывать при проведении экспериментов. На начальном этапе работы с неисследованными ранее объектами были изучены вопросы обеспечения проб достаточным для определения количественного содержания гликогена размером биоматериала.

Отработку метода проводили на модельной свободноживущей нематоде *C. elegans*. Данный организм является одним из основных объектов исследований, посвященных изучению механизмов стрессоустойчивости, поддержания запасов энергии и старения организмов, в которых показана ведущая роль гликогена [143, 167, 223], поэтому востребованы методы определения данного запасного вещества и измерения его концентрации. Ограниченность применения качественных методов обусловлена довольно высокой степенью индивидуальной вариабельности интенсивности окрашивания нематод *C. elegans*, а полуколичественных – высокой стоимостью анализа и сложностью интерпретации результатов [115]. Выбранный нами спектрофотометрический метод позволяет обеспечить количественную оценку содержания гликогена и может быть применим в различных исследованиях с *C. elegans* при условии достаточного количества опытного материала. Необходимый объем биоматериала, в зависимости от стадии развития нематод, составляет по нашим оценкам не менее 50 тыс. экземпляров. Получение биомассы

нематод, синхронизированных на одной стадии развития, представляет собой трудоемкий и сложный по методическому исполнению процесс, в связи с чем в настоящем исследовании мы ограничились использованием смешанной культуры. Содержание гликогена в *C. elegans*, установленное нами в процессе предварительных экспериментов, составило $1,821 \pm 0,004$ нг/экз. В доступных литературных источниках вопрос о количественном содержании гликогена и его динамике в процессе развития *C. elegans* остается по настоящее время открытым.

Учитывая тот факт, что относительное содержание гликогена в паразитических сколецидах, как правило, выше чем в свободноживущих, для анализа концентрации полисахарида достаточно меньшего объема биоматериала. Так, для определения концентрации искомого вещества в зрелых мышечных личинках трихинелл требуется всего 1-10 тыс. экземпляров. Размеры гельминтов при этом можно условно считать сопоставимыми: личинки первой стадии развития *C. elegans* и *T. spiralis* имеют длину около 0,1 мм, а половозрелые особи свободноживущей нематоды и мышечные личинки паразитической – около 1 мм [28, 111].

При исследовании содержания гликогена в процессе биологического цикла развития *T. spiralis* было установлено, что общее количество гликогена увеличивается в процессе формирования личинки в мышечной ткани, а потом резко снижается, когда личинки растут, линяют и развиваются перед достижением половой зрелости в кишечнике нового хозяина.

Было установлено, что на 14 сутки после заражения в юных мышечных личинках трихинелл концентрация полисахарида достаточно низкая и составляет всего $2,8 \pm 1,2$ нг/экз. Переверзева Э.В., используя гистохимические методы анализа, отмечает появление гранул исследуемого вещества в личинках только на 10-15 сутки, в то время как в срок 7-10 суток после заражения трихинеллы не содержат гликогена [62]. Медленное накопление гликогена трихинеллами связано с повышенной активностью ферментов катаболизма углеводов и усиленным синтезом АТФ, благодаря чему обеспечиваются энергией процессы

приживаемости в мышцах, рост организма и дифференциация клеточных структур.

Запасы резервного полисахарида в личинках трихинелл затем быстро увеличиваются между 14 и 28 днем после заражения [257]. G.L. Stewar [231] и Э.В. Переверзева [61] при анализе окрашенных гистохимически срезов отмечали в этот срок прирост гликогена более, чем в 2 раза. Интересно привести для сравнения данные, полученные M.W. Kilgore. Он сообщает, что в новорожденных личинках трихинелл гликоген составляет 7,8% от их сухой массы, а в 45-суточных мышечных личинках – 16,1% [155]. Если учесть, что при внедрении личинок в мышечные волокна, они увеличиваются в размерах более, чем в 10 раз, в первые 20 дней развития [84], то следует ожидать значительного повышения абсолютного содержания в них гликогена. По нашим данным, в период с 14 до 28 дней инвазии концентрация гликогена в личинках увеличилась почти в 5 раз – с 2,8 нг до 13,6 нг.

До полутора месяцев личинки продолжают активно накапливать гликоген, его концентрация при этом составляет $77,1 \pm 2,5$ нг/экз. Затем скорость формирования запасов полисахарида значительно снижается. Некоторые исследователи отмечали это явление уже после 28 дней инвазии [231, 257].

По данным нашего исследования максимальная концентрация гликогена достигается в 4 месяца: $93,0 \pm 2,9$ нг/экз. Переверзева Э.В. [61] регистрировала максимум содержания гликогена при использовании гистологического метода несколько позже – у 6-месячных личинок. По всей видимости, после того, как закончен органогенез и образована капсула, дальнейший процесс накопления резервного полисахарида будет сильно зависеть от разных факторов, к которым можно отнести особенности используемого изолята паразита, вид хозяина, условия его содержания и другие.

В последующие месяцы содержание гликогена начинает постепенно снижаться и составляет у 20-месячных личинок $78,6 \pm 2,3$ нг/экз. Увеличение потребления гликогена трихинеллами вызвано смещением соотношения синтеза/распада полимера в сторону катаболизма и, вероятно, связано с

процессом обызвествления капсулы, наблюдаемым в последние сроки эксперимента, что, в свою очередь, отражается на жизнеспособности личинок трихинелл: к 20 месяцу данный показатель уменьшается на 5%.

Содержание гликогена в мышечных личинках трихинелл, определенное другими исследователями антроновым методом, составило около 78,4 нг/экз. [127]. Это значение согласуется с полученными нами данными.

Тот факт, что общее количество гликогена, содержащееся в личинках, значительно увеличивается по мере роста и развития и долго остается на высоком уровне, указывает на то, что данное энергетическое соединение требуется и на более поздних этапах развития [98].

При исследовании содержания гликогена у кишечных трихинелл нами было установлено, что через 3 ч после заражения лабораторных животных, содержание резервного вещества уменьшилось с $90 \pm 1,8$ нг/экз. до 47,2 нг/экз., через 6 ч после инвазии сократилось еще почти вдвое, а уже через сутки достигло столь низкого значения, что определить его в имеющемся объеме биомассы не удалось. Гридасова Л.Ф. [36], используя гистохимические методы, также наблюдала снижение уровня гликогена в трихинеллах между 12 и 24 ч после инвазии, а Ferguson J.D. [136] определил, что через сутки после инвазии содержание гликогена составляет всего 0,7% в расчете на сухую массу нематоды (что крайне мало по сравнению с 16% от сухой массы мышечных личинок). Таким образом, исследователи, использующие в работе разные методы определения гликогена, пришли к единому выводу о том, что содержание гликогена в кишечных трихинеллах через сутки после заражения достигает крайне низкого значения. О дальнейшем содержании полисахарида в процессе развития кишечных трихинелл мнения расходятся. Одни авторы [136, 155] наблюдают восстановление некоторого количества запасного вещества к 4-ым суткам после инвазии (до 1,3-4,9% от сухой массы нематоды), что говорит об успешном приспособлении паразита к новой среде, а другие [36] отмечают постепенную утилизацию гликогена вплоть до полного исчезновения через 10-12 дней. Мы полагаем, что такие отличия могут объясняться, в том числе, непостоянным

содержанием экзогенных питательных веществ в среде первого порядка в абсорбтивный и постабсорбтивный периоды хозяина. Относительно низкое количество гликогена в половозрелых трихинеллах служит признаком наличия аэробного метаболизма, благодаря которому гельминты малого размера могут существовать в подобных условиях.

С учетом всего вышесказанного, особенно важным и критичным периодом в развитии трихинелл являются первые часы в кишечнике хозяина, когда паразиты, из-за низкой проницаемости кутикулы и ограниченного доступа питательных веществ, находятся в сильной зависимости от эндогенных ресурсов, запасенных на предыдущей стадии развития. Высокие энергетические потребности трихинелл в период, пока они не могут полноценно питаться и пока в их метаболизме не стали преобладать аэробные пути, способствующие более эффективному в энергетическом отношении катаболизму веществ, целиком зависят от содержания данного соединения. Если концентрация запасенного гликогена окажется недостаточной для обеспечения энергетических нужд развивающегося паразита в течение первых суток после инвазии, трихинеллы утратят свои инвазионные свойства. В данном отношении обращают на себя внимание представленные Геллер Э.Р. и Гридасовой Л.Ф. [29] сведения о том, что приживаемость личинок трихинелл зависит от их возраста, что может быть в том числе связано с содержанием в них гликогена. Не менее интересным является наблюдение Malakauskas A. и Karpl S.M.O. [177], свидетельствующее, что, низкие температуры, как правило, лучше переносят мышечные личинки трихинелл среднего возраста (10-20 недель), чем раннего (5 недель) или позднего (40 недель).

Изучение динамики расходования гликогена при неблагоприятных условиях среды позволяет судить о его роли в качестве основного энергетического источника в обеспечении сохранности личинок трихинелл.

Взаимосвязь между содержанием гликогена в личинках трихинелл и сохранением таких биологических свойств возбудителя, как жизнеспособность и инвазионность, была исследована при хранении тушек экспериментально

инвазированных *T. nativa* и *T. pseudospiralis* лабораторных крыс в естественных условиях среды Центрального региона России в зимне-весенний период.

Было установлено, что личинки трихинелл в тушках инвазированных крыс, заложенных на хранение во внешней среде в начале зимнего периода (в декабре), остаются жизнеспособными на протяжении 4-5 месяцев. Об устойчивости трихинелл к низким температурам в интервале от 0 до -20°C сообщают и другие исследователи [2, 22, 75, 113, 116, 131, 132, 152, 168, 194, 202, 226]. Важным фактором, также влияющим на сохранение личинок трихинелл в тушках животных-хозяев в холодное время года, является относительное постоянство среды в условиях субнивиума (под снегом) [202, 217].

По нашим данным, высокая жизнеспособность (99,5-100%) личинок *T. nativa*, выделенных из тушек подопытных животных, сохранялась в исследованном регионе на протяжении 103 суток, с декабря по апрель. Мышечные личинки *T. pseudospiralis* оказались менее резистентными: к тому же сроку относительное количество жизнеспособных особей составило 85,7%, а на 154 сутки (в мае) достигло 54,7%.

При таких показателях жизнеспособности инвазионность личинок трихинелл на конечном этапе эксперимента оказалась низкой. Трихинеллами *T. nativa* (жизнеспособность 99,5%) заразилось одно из трех животных, а *T. pseudospiralis* (жизнеспособность 54,7%) животные не заразились вовсе. Явление, при котором личинки, оставаясь жизнеспособными после промораживания, оказывались неинвазионными по результатам биопробы, описывали и другие авторы [76, 125].

При этом с декабря по апрель наблюдали постепенное уменьшение концентрации гликогена в личинках трихинелл обоих видов: с $45,7 \pm 3,1$ до $14,8 \pm 1,0$ нг/экз. в *T. nativa* и с $32,7 \pm 0,6$ до $3,2 \pm 0,3$ нг/экз. в *T. pseudospiralis*. Содержание гликогена в личинках *T. pseudospiralis* в мае составило $2,3 \pm 0,3$ нг/экз. и мало отличалось от предыдущего показания в апреле, что в совокупности с существенным снижением показателя жизнеспособности указывает на приближение количества запасных энергетических субстратов к минимальному

уровню для выживания в испытанных условиях. На основании вышеуказанных сведений можно предположить, что инвазионность личинок *T. pseudospiralis* начала снижаться ранее конечных сроков эксперимента – 154 суток.

Полученные результаты свидетельствуют об определенных видовых отличиях между *T. nativa* и *T. pseudospiralis*.

Известно, что *T. nativa* является наиболее морозоустойчивым видом трихинелл [21, 75, 76, 227]. Быстрая смена и колебания температур, замораживание и оттаивание личинок более одного раза оказывают менее выраженное воздействие на *T. nativa* по сравнению с другими видами трихинелл [125, 203]. Рипатти П.О. и Бритов В.А. [70] высказали предположение, что одна из причин резистентности данного вида нематод к промораживанию и перепадам температур заключается в отличительной характеристике жирнокислотного спектра. В личинках *T. nativa* были обнаружены полиненасыщенные жирные кислоты (докозапентаеновая 22:5 и докозагексаеновая 22:6), слабо подверженные влиянию температурных сдвигов и способствующие по этой причине сохранению нативности связанных с ними ключевых белков.

Стоит также обратить внимание на такой отличительный признак между используемыми видами трихинелл, как способность образовывать капсулу. По мнению Гаркави Б.Л. [27], наличие или отсутствие коллагеновой капсулы, окружающей личинку в мышечной ткани, очень важно для сохранения ее жизнеспособности в разрушающемся гниющем трупе (такие условия наблюдали при повышении температуры среды на конечном этапе эксперимента). Другие авторы также [196, 202, 231] отмечают, что мышечные личинки не образующих капсулу видов менее резистентны к процессам гниения и разложения в сравнении с капсулообразующими видами трихинелл. Из чего следует, что капсула, в определенной мере, предотвращает влияние неблагоприятных факторов среды на жизнеспособность личинок трихинелл.

Интересным для рассмотрения является тот факт, что динамика изменения концентрации гликогена двух возбудителей трихинеллеза в одних условиях проведения эксперимента оказалась сопоставимой, несмотря на некоторые

различия между используемыми видами трихинелл, такие как способность образовывать капсулу, содержание запасных веществ и ряд других характерных черт в их биосинтезе и строении на молекулярном уровне, которые могут особым образом влиять на поддержание жизнеспособности в неблагоприятных условиях.

Способность накапливать гликоген в столь значимом количестве способствует сохранению личинок трихинелл в трупах павших животных в холодное время года в течение нескольких месяцев, что обеспечивает длительное персистирование возбудителя в биоценозах.

Одним из факторов, существенным образом влияющих на процессы метаболизма, а значит, и концентрацию гликогена в гельминтах, является температура. Влияние температуры на концентрацию гликогена в гельминтах, их жизнеспособность и инвазионность, было изучено в лабораторных условиях на примере представителей различных таксономических групп.

Так, было установлено, что при температуре среды $37\pm 1^\circ\text{C}$ мышечные личинки *T. nativa* полностью утрачивают двигательную активность, а следовательно, и жизнеспособность, через 3 суток при инкубировании в физиологическом растворе. Концентрация гликогена в них при этом снижалась с 42 ± 4 нг/экз. до 7 ± 2 нг/экз. В условиях отсутствия экзогенных питательных веществ при повышенных температурах значительная доля энергетического субстрата использовалась личинками для поддержания двигательной активности и функций основного обмена, что в конечном итоге привело к быстрому исчерпанию ресурсов и иммобилизации.

Было изучено влияние различных температур на содержание гликогена, жизнеспособность и инвазионность культуры адолескариев *F. hepatica*. Повышенные температуры (до $38\pm 2^\circ\text{C}$) оказывали наиболее существенный эффект на изучаемые показатели. В период между первыми и вторыми сутками хранения жизнеспособность адолескариев снизилась с 91,5 до 13,2%, на третьи сутки подвижных особей выявлено не было. Концентрация гликогена ко вторым суткам уменьшилась с 0,120 мкг/экз. до 0,081 мкг/экз. Не такое значительное, как у трихинелл, снижение относительного количества запасного полисахарида

объясняется особенностями биологии данного вида [33] и может быть, в том числе, связано с преобладанием аэробного метаболизма на данной стадии развития (при условии доступности кислорода).

Более благоприятными для сохранения адолескариев фасциол явились температуры в диапазоне от $-2\pm 2^{\circ}\text{C}$ до $6\pm 2^{\circ}\text{C}$, при которых личинки оставались жизнеспособными и инвазионными в течение нескольких месяцев. Адолескарии полностью утратили двигательную активность при отрицательных температурах на 3 месяц эксперимента, при положительных – на 15 месяц, что также сопровождалось снижением концентрации гликогена. Сохранение личиночной формы возбудителя фасциоза при испытанных температурных режимах столь длительное время способствует распространению инвазии, что подтверждается в работах других исследователей [105, 156].

Интересно отметить, что при относительно низком уровне содержания гликогена, составляющем 0,061 мкг/экз. (жизнеспособность 6,5%) и 0,081 мкг/экз. (жизнеспособность 13,2%), по результатам биопробы на 90 сутки после заражения животных половозрелые трематоды с яйцами детектировались в опыте только у одного из трех животных, в то время как миграционные пути неполовозрелых фасциол в печени были обнаружены у всей группы.

Таким образом, продолжительность существования личинок гельминтов в среде без питательных веществ коррелирует со скоростью расходования гликогена, которая, в свою очередь, зависит от их подвижности и температуры окружающей среды. Отмеченную закономерность в той или иной мере наблюдали и другие авторы при изучении различных гельминтов [31, 34, 65, 66, 81, 85, 91, 238, 254].

Полученные результаты свидетельствуют о возможности контроля жизнеспособности и инвазионности культур фасциол в заданных условиях методом инструментального определения содержания гликогена.

В целом, динамику содержания гликогена в гельминтах при воздействии неблагоприятных факторов можно также рассматривать с точки зрения

адаптационных возможностей их метаболизма к изменяющимся условиям окружающей среды.

Расход гликогена в качестве энергетического субстрата наблюдается у гельминтов и при воздействии антигельминтных препаратов. Возможность применения предлагаемого нами метода в области химиотерапии изучали на примере сравнения действия антигельминтиков, альбендазола и триклабендазола, в системе «паразит (фасциола *F. hepatica*) – хозяин (лабораторная крыса)».

Чтобы верно интерпретировать полученные результаты, необходимо прежде привести имеющиеся литературные данные о динамике содержания метаболитов бензимидазолов в крови животных после введения препаратов, что прямым образом связано с исследуемым нами показателем энергетического обмена гельминтов – концентрацией гликогена.

Известно, что профиль метаболитов определенного антигельминтика из группы бензимидазолов у разных видов млекопитающих одинаков, но при этом относительное соотношение метаболитов существенно отличается [134]. Также разнятся пиковые концентрации в крови и время их достижения. Максимальная концентрация метаболитов триклабендазола (сульфоксида и сульфона триклабендазола) в крови бычков отмечена через 18 ч после введения препарата [52], овец – через 22 ч [185], кроликов – между 7 и 9 ч [88], альбендазола (сульфоксида и сульфона альбендазола) в крови овец – через 12 ч [126], крыс – через 6 ч [126]. В крови овец метаболиты ТКБ сохраняются около 120 ч (доза по действующему веществу 10 мг/кг) [185], метаболиты АБ – на протяжении 54 ч (5 мг/кг) [126], в то время как из крови крыс (10 мг/кг), модельного организма наших исследований, выводятся уже через 18 ч после терапии [126].

Наибольшее влияние бензимидазолов на углеводный метаболизм *F. hepatica*, проявляющееся в снижении концентрации гликогена, использующегося в качестве источника энергии, зарегистрировано в экспериментах на 24 ч после введения препарата. С учетом ретроспективных данных [126] можно заключить, что при использовании препаратов в указанных дозах значимое потребление гликогена трематодами начинается еще до

достижения пиковой концентрации метаболитов бензимидазолов в крови крыс и что уровень гликогена достигает минимального значения не ранее 6 ч после начала терапии.

По истечении 24 ч, т.е. после выведения метаболитов действующих веществ из крови крыс, наблюдали постепенное накопление исследуемого полисахарида и достижение его резервов исходного уровня. Способность фасциол ресинтезировать запасное вещество при уменьшении поражающего действия стресс-фактора, паразитируя в богатой углеводами среде, была показана и другими авторами [121, 180, 211, 242, 252]. Мы полагаем, что, чем более выраженное действие оказывает антигельминтик на фасциол, тем медленнее ресинтезируется гликоген. Так, содержание гликогена в неполовозрелых фасциолах восстанавливалось практически до исходного уровня уже на третьи сутки после однократного введения крысам альбендазола, а после многократного – приблизилось к исходному на 10-е сутки, в то время как после терапии триклабендазолом так и не достигло контрольных значений в указанные сроки.

Известно, что АБ более эффективен против имагинальных фасциол, чем против преимагинальных, в то время как ТКБ высокоэффективен и специфичен для фасциол разного возраста [3, 5]. В нашем исследовании мы получили подтверждение данному факту путем сравнения динамики концентрации гликогена в фасциолах после терапии крыс антигельминтиками в рекомендуемых производителями дозах. Альбендазол не оказал достоверного влияния на содержание гликогена в неполовозрелых фасциолах, в отличие от триклабендазола, а в эксперименте с половозрелыми фасциолами статистически значимых отличий между действием двух препаратов обнаружено не было. Отличия в восприимчивости фасциол разного возраста к данным препаратам связаны с особенностями метаболизма на разных этапах развития.

Значимых различий в содержании гликогена после терапии ТКБ в используемых дозах в виде субстанции и в виде комплекса с водорастворимым полимером в изучаемые сроки не зафиксировано, что указывает на схожесть протекаемых процессов метаболизма гликогена в заданных условиях. Иначе

говоря, влияние ТКБ в дозе 5 мг/кг и препарата в 5 раз меньшей дозе, обладающего улучшенными свойствами растворимости и биодоступности, на углеводный метаболизм фасциол оказалось схожим между собой, что косвенно подтверждает высокую оценку эффективности супрамолекулярного комплекса, данную авторами [50, 51].

При использовании схемы терапии фасциолеза, направленной на более длительное сохранение метаболитов действующих веществ в крови хозяина, нам удалось продемонстрировать, как содержание гликогена в фасциолах отражает фармакокинетические процессы, происходящие в организме крыс.

На основании приведенных выше литературных данных [126] можно полагать, что наибольшей концентрации метаболиты бензимидазолов в крови крыс при заданных условиях эксперимента достигают между 6 и 18 ч в первые сутки эксперимента и между 30 и 42 ч во вторые сутки эксперимента, а наименьшей концентрации – около 24 ч и 48 ч после начала терапии.

Таким образом, в настоящем исследовании наблюдается соотношение процессов синтеза и распада гликогена, смещаемое в ту или иную сторону в зависимости от силы воздействия химиопрепаратов и метаболической реактивности тестируемых объектов.

Через 6 ч после начала терапии, в период максимальной концентрации метаболитов в крови крыс, содержание гликогена в фасциолах по сравнению с контролем снижается, а после получения второй дозы препарата достигает суточного минимума на 24 ч от начала эксперимента. В этот же срок метаболиты бензимидазолов активно выводятся из крови крыс, и фасциолы начинают ресинтезировать гликоген, что зафиксировано на 30 ч опыта. Повторное получение препарата на 24 и 30 ч эксперимента приводит к смене вектора метаболизма: гликоген мобилизуется и достигает минимального уровня, который удалось отметить в опытных условиях, на 48 ч.

В данном эксперименте повторное введение антигельминтиков обеспечило более существенное воздействие на углеводный и энергетический метаболизм фасциол, что выразилось в наиболее низком содержании гликогена. Об успешном

применении в медицине схемы лечения с двукратным приемом триклабендазола в течение 2-х дней в дозе 10 мг/кг сообщал Ogorza D.L. с соавт [195]: показатель эффективности при введении одной дозы превышал 79%, а при двух составил 100%.

Несмотря на снижение уровня гликогена более чем в 2 раза по отношению к контролю, все выделенные трематоды оставались подвижными, а значит, жизнеспособными, что говорит об их способности накапливать резервный полисахарид в количестве, избыточном для обеспечения жизнеспособности в стабильных условиях среды первого порядка. За счет этих избыточных запасов гликогена и осуществляются репарационные и адаптационные процессы при воздействии стрессора, что позволяет возбудителю сохраняться в организме хозяина при воздействии различных неблагоприятных факторов химической природы, в том числе способствовать выработыванию резистентности к антигельминтным препаратам.

Процесс адаптации паразита к химиотерапевтическим препаратам, наблюдаемый в наших исследованиях, обеспечивается за счет энергетических ресурсов и может происходить только при условии сохранения функционирования жизненно важных систем организма. Мы направленно использовали нелетальные дозы препарата для фасциол, паразитирующих у крыс, благодаря чему смогли наблюдать сначала за преобладанием катаболических процессов в период адаптации, а затем за анаболическими процессами в период восстановления. Выраженный фасциолоцидный эффект при использовании данной модели хозяина отмечался авторами при существенно завышенных терапевтических дозах. Так, Coles G.C. [117] установил 99% эффективность триклабендазола против *F. hepatica* у крыс в дозе 40 мг/кг, что значительно выше по сравнению с рекомендуемыми нормами при лечении фасциолеза крупного и мелкого рогатого скота и человека. Сообщается также о снижении количества гельминтов на 40% с помощью однократной дозы триклабендазола 20 мг/кг против 2-недельных преимагинальных фасциол [153].

Требует своего дальнейшего изучения вопрос о динамике содержания гликогена в фасциолах при использовании препаратов в повышенных дозах, которые приводят к гибели гельминтов.

Полученные нами с помощью спектрофотометрического анализа сведения о концентрации гликогена в *F. hepatica* (0,041-0,045 мг/мг) соотносятся с опубликованными von Brand Т. и Mercado Т.І., в которых говорится о 4%-ном содержании данного резервного полисахарида в фасциолах, выделенных их желчных протоков печени крупного рогатого скота [252].

По изменению концентрации гликогена можно судить о степени влияния антигельминтика на энергетический обмен фасциол, обеспечивающий их выживание, что позволяет рассматривать гликоген в качестве маркера для оценки эффективности действия антигельминтных препаратов.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о важной роли гликогена в биологическом цикле развития гельминтов и обеспечении переживания неблагоприятных условий внешней среды. Значительные запасы полисахарида способствуют длительному поддержанию процессов адаптации и репарации и, следовательно, лучшему сохранению и распространению возбудителей инвазии в биогеоценозах. При недостаточном уровне гликогена, даже оставаясь при этом жизнеспособным, возбудитель утрачивает инвазионные свойства, поскольку имеющегося энергетического субстрата оказывается недостаточно для адаптации (приживаемости) к новым условиям среды первого порядка и последующему развитию в организме хозяина.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании анализа литературных и полученных в настоящей работе данных можно заключить, что гликоген играет ведущую роль в биологическом цикле развития гельминтов и их сохраняемости в неблагоприятных условиях окружающей среды. Нарушение процессов метаболизма, вызванное действием различных факторов, приводит к «сбоям» в работе систем гомеостаза клетки и всего организма в целом. Если количество и распространенность этих повреждений превышают компенсаторные возможности гельминта, поддерживаемые за счет постоянного притока энергии, то функционирование внутренних систем нарушается и наступает гибель. Гликоген в данном случае можно рассматривать в качестве индикатора влияния неблагоприятных факторов на углеводный и энергетический метаболизм гельминтов как основу их выживания.

По результатам выполненных исследований можно заключить:

1. Усовершенствована спектрофотометрическая методика количественного определения гликогена в гельминтах, позволяющая специфично определять содержание данного полисахарида в динамике. Оптимизирован процесс пробоподготовки, определено минимальное необходимое количество биоматериала для детектирования искомого вещества в пробах (для изучаемых объектов) и температурные условия проведения анализа.

2. Установлена зависимость инвазионности и жизнеспособности трихинелл от содержания гликогена. На примере *T. pseudospiralis* показано, что при низком уровне гликогена ($2,3 \pm 0,3$ нг/экз.) жизнеспособные личинки утрачивают инвазионные свойства.

3. Расходование резервного энергетического субстрата личинками двух видов трихинелл, капсулообразующего (*T. nativa*) и бескапсульного (*T. pseudospiralis*), характеризуется схожей динамикой в естественных условиях зимне-весеннего периода в Центральном регионе, при этом абсолютное содержание гликогена в них различается на 12 нг/экз.

4. Установлена корреляционная зависимость ($r=0,91$) между содержанием гликогена и показателем жизнеспособности адолескариев фасциолы под действием различных температур.

5. Динамика содержания гликогена в фасциолах после терапии препаратами, производными бензимидазолов, отражает степень влияния антигельминтиков на паразита на уровне метаболизма и характеризует реактивность фасциол. Подтверждена низкая эффективность альбендазола против преимагинальных фасциол по сравнению с триклабендазолом и высокая оценка эффективности супрамолекулярного комплекса триклабендазола с поливинилпирролидоном.

6. Концентрация гликогена в фасциолах после терапии инвазированных крыс изменяется в соответствии с уровнем метаболитов действующих веществ в организме хозяина. Повторный прием антигельминтиков обеспечил более существенное воздействие на углеводный и энергетический метаболизм фасциол, что выразилось в наиболее низком по сравнению с контролем ($0,045 \pm 0,001$ мг/мг) содержании гликогена, составляющем $0,019 \pm 0,003$ мг/мг после терапии триклабендазолом и $0,021 \pm 0,004$ мг/мг – альбендазолом.

7. Определение концентрации гликогена в гельминтах позволяет повысить информативность оценки эффективности действия антигельминтных препаратов и может служить дополнительным критерием при разработке средств и методов терапии инвазий.

5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Предлагаемый в настоящей работе спектрофотометрический метод определения содержания гликогена в гельминтах может быть использован как в научных, так и в прикладных целях.

С его помощью можно существенным образом дополнить имеющиеся знания об энергетическом метаболизме у гельминтов, обеспечивающем их жизнедеятельность и выживание в процессе реализации биологического цикла и при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды за счет энергетического резервного субстрата – гликогена.

Метод может быть применим в области изучения биологических основ профилактики гельминтозоозов животных и человека. В частности, данные, полученные при изучении содержания гликогена в личинках трихинелл, выделенных из тушек экспериментально инвазированных крыс, хранившихся в зимне-весенний период в естественных условиях Центрального региона России, могут быть использованы при разработке профилактических мероприятий при трихинеллезе.

Описанный метод перспективен для тестирования средств и методов обезвреживания инвазионного материала, поскольку анализируемый полисахарид может рассматриваться в качестве дополнительного критерия при оценке инвазионности. Особенно интересным в данном отношении является тот факт, что при недостаточном уровне гликогена, даже оставаясь при этом жизнеспособным, возбудитель может утрачивать инвазионные свойства, что показано нами на примере трихинелл.

Показана возможность применения метода в области терапии, при изучении действия антигельминтных препаратов. На примере фасциол продемонстрировано, что гликоген является достаточно чувствительным индикатором влияния химиопрепаратов на метаболизм гельминтов. Определение содержания гликогена спектрофотометрическим методом позволяет повысить информативность оценки эффективности действия антигельминтиков на

гельминтов, раскрыть некоторые аспекты механизма действия химиопрепаратов и использоваться для разработки новых и совершенствования старых схем терапии.

Полученные результаты исследования позволили разработать следующие нормативные документы:

Методические положения оценки инвазионной способности личинок гельминтозоонозов по содержанию гликогена (рассмотрены и одобрены секцией «Инвазионные болезни» ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, протокол №3 от 25.10.2019 г.).

Патент № 2681167 на изобретение «Способ определения количества гликогена в личинках трихинелл для контроля качества обезвреживания инвазионного материала» (зарегистрирован Государственном реестре изобретений // Бюл. № 7 от 04.03.2019 г.)

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБ – альбендазол;

АМФ – аденозинмонофосфат;

АТФ – аденозинтрифосфат;

ацетил-КоА – ацетил-коэнзим А;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

Г-1-Ф – глюкозо-1-фосфат;

Г-6-Ф – глюкозо-6-фосфат;

ИЖС – искусственный желудочный сок;

ИТФ – инозинтрифосфат;

ЛДГ – лактатдегидрогеназа;

ПВП – поливинилпирролидон;

ПК – пируваткиназа;

ТКБ – триклабендазол;

УДФ-глюкоза – уридиндифосфатглюкоза;

ШИК – Шифф-йодная кислота;

ФЕП – фосфоенолпируват;

ФЕПКК – фосфоенолпируваткарбоксикиназа;

LB (Lennox Broth) – среда Леннокса;

NGM (Nematode Growth Medium) – среда для культивирования нематод.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев, О.Н. Обезвреживание личинок трихинелл в мышечной ткани животных методом глубокого замораживания / О.Н. Андреев // Российский паразитологический журнал. – 2011. – №. 4. – С. 47-51.
2. Андреев, О.Н. Устойчивость личинок *Trichinella spiralis* в условиях охотохозяйства Рязанской области в зимний период / О.Н. Андреев // Теория и практика паразитарных болезней». – 2010. – №. 11. – С. 19-22.
3. Архипов, И.А. Антигельминтики: фармакология и применение /И.А. Архипов. – М., 2009. – 406 с.
4. Архипов, И.А. Супрамолекулярные комплексы антигельминтных бензимидазольных препаратов. Получение и свойства / И.А. Архипов, С.С. Халиков, А.В. Душкин, А.И. Варламова, М.Б. Мусаев, Н.Э. Поляков, Ю.С. Чистяченко, К.М. Садов, М.С. Халиков // ВНИИП им. К.И. Скрябина. – М., 2017. – 90 с.
5. Архипов, И.А. Эффективность новых антигельминтиков против фасциол разного возраста / И.А. Архипов, С.З. Закирова, Ф.С. Михайлицын // Российский паразитологический журнал. – 2012. – №. 2. – С. 88-90.
6. Астафьев, Б.А. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине / Б.А. Астафьев, Л.С. Яроцкий, М.Н. Лебедева // Наука. – 1989. – 279 с.
7. Атауллаханов, Ф.И. Каскады ферментативных реакций и их роль в биологии / Ф.И. Атауллаханов // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6. – №. 7. – С. 2-10.
8. Безбородкина, Н.Н. Анализ структуры гликогена в гепатоцитах крыс с использованием цитохимического и FRET методов / Н.Н. Безбородкина, Г.И. Штейн, Е.В. Сивова, А.Ю. Честнова, Б.Н. Кудрявцев // Цитология. – 2011. – Т. 53. – №. 7. – С. 555-563.
9. Березанцев, Ю.А. Проблема тканевого паразитизма / Ю.А. Березанцев // Паразитология. – 1982. – Т. 16. - №. 4. – С. 265-273.

10. Березанцев, Ю.А. Простой способ исследования мышц на трихинеллез методом переваривания в искусственном желудочном соке / Ю.А. Березанцев // Лабораторное дело. – 1960. – № 6. – С. 7-8.
11. Бибик, О.И. Гистологические и гистохимические методы исследования как критерии оценки эффективности действия антигельминтных препаратов на органы и ткани трематод / О.И. Бибик, И.А. Архипов // Российский паразитологический журнал. – 2020. – Т. 14. – №. 2. – С.76-82.
12. Бибик, О.И. Гистохимические исследования эктосоматических органов трематод - тегумента и кишечника, как основа функциональной морфологии / О.И. Бибик, Л.В. Начева // Наука в современном информационном обществе. – 2017. – С. 9-12.
13. Бибик, О.И. Гистохимический анализ тканей трематод до и после действия антигельминтиками / О.И. Бибик, И.А. Архипов // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2013. – №. 14. – С. 68-70.
14. Бибик, О.И. Морфофункциональная характеристика органов и тканей паразита и хозяина при трематодозах после химиотерапии антигельминтиками / О. И. Бибик // Российский паразитологический журнал. – 2008. – №. 1. – С. 99-106.
15. Бибик, О.И. Патоморфологический контроль изменений в органах и тканях половой системы трематоды *Dicrocoelium lanceatum* после воздействия антигельминтика фаскоцида / О.И. Бибик // Российский паразитологический журнал. – 2010. – №. 4. – С. 41-44.
16. Бибик, О.И. Патоморфологический контроль изменений в органах и тканях половой системы *Dicrocoelium lanceatum* после действия фаскоцида как критерий оценки противотрематодной эффективности антигельминтика / О.И. Бибик, Л.В. Начева, И.А. Архипов, Ю.А. Нестерок // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2016. – № 17. – С. 75-77.
17. Бибик, О.И. Патоморфология и гистохимическая реактивность органов и тканей трематод после действия антигельминтиков: Автореф. дис. ... канд. биол. наук 03.00.19 / Оксана Ивановна Бибик. – Москва, 1997. – 18 с.

18. Бибик, О.И. Патоморфология органов и тканей *Fasciola hepatica* и *Paramphistomum cervi* после воздействия антитрема / О.И. Бибик, Л.В. Начева, И.А. Архипов // Российский паразитологический журнал. – 2012. – №. 1. – С. 13-20.
19. Бибик, О.И. Сравнительные микроморфологические исследования органов и тканей *Opisthorchis felineus* после действия мебендазола и празиквантела в эксперименте / О.И. Бибик, Л.В. Начева, Ю.А. Нестерок // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2016. – №. 17. – С. 71-74.
20. Бисерова, Н.М. Морфофункциональная дифференциация покровных тканей цестоды *Acanthobothrium dujardini* / Н.М. Бисерова, Б.И. Куперман // Паразитология. – 1983. – Т. 17. – №. 5. – С. 382-390.
21. Бритов, В.А. Возбудители трихинеллеза / В.А. Бритов – М.: Наука, 1982. – 271 с.
22. Букина, Л.А. Влияние процесса ферментации на сохранение инвазионных свойств личинок трихинелл в традиционном продукте питания «Копальхен» / Л.А. Букина, С.А. Ермолина, А.С. Сюткина, И.М. Одоевская // Российский паразитологический журнал. – 2013. – №. 1. – С. 28-33.
23. Буренина, Э.А. Влияние антигельминтных препаратов на активность фруктозобисфосфатазы *Bothriocephalus scorpii* (cestoda: bothriocephalidae) / Э.А. Буренина // Российский паразитологический журнал. – 2010. – №. 2. – С. 80-86.
24. Буренина, Э.А. Конечные продукты углеводного обмена трематод, паразитирующих у крупного рогатого скота / Э.А. Буренина // Паразитология. – 2000. – Т. 34. – №. 1. – С. 32-41.
25. Буренина, Э.А. Особенности углеводного обмена *Bothriocephalic scorpii* (Cestoda: Bothriocephalidae) / Э.А. Буренина // Паразитология. – 2003. – Т. 37. – №. 4. – С. 306-315.
26. Гапонов, С.П. Паразитические черви (введение в гельминтологию): учебное пособие / С.П. Гапонов – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2005. – 205с.

27. Гаркави, Б.Л. Трихинеллез, вызываемый *Trichinella pseudospiralis* (морфология и биология возбудителя, эпизоотология и эпидемиология, диагностика, меры борьбы и профилактика) / Б.Л. Гаркави // Российский паразитологический журнал. – 2007. – №. 2. – С. 35-116.
28. Геллер, Э.Р. Морфо-физиологические критерии таксономической самостоятельности вида *Trichinella pseudospiralis* Garkavi, 1972 / Э.Р. Геллер, А.Н. Малыхина, Л.Н. Силакова, Е.В. Тимонов // Паразитология. – 1977. – Т. 11. – №. 2. – С. 113-115.
29. Геллер, Э.Р. Приживаемость декапсулированных трихинелл в тонком кишечнике белых мышей. – В кн.: Гельминты человека, животных и растений (К 90-летию акад. К.И. Скрябина). / Э.Р. Геллер, Л.Ф. Гридасова. – М., 1968. – С. 151-156.
30. Геллер, Э.Р. Трихинеллез / Э.Р. Геллер. – М., 1976. – С. 6-41.
31. Гинецинская, Т.А. Гликоген и жир на разных фазах жизненного цикла сосальщиков. Ч. II. Биологическое значение гликогена и жира / Т.А. Гинецинская, А.А. Добровольский // Вест. ЛГУ. – 1963. – №. 3. – С. 23-33.
32. Гинецинская, Т.А. Закономерности отложения запасных питательных веществ в желточниках плоских червей / Т.А. Гинецинская, В. Пальм, В.В. Беседина, Т.А. Тимофеева // Паразитология. – 1971. – Т. 5. – №. 2. – С. 147-154.
33. Гинецинская, Т.А. Роль гликогена в биологии личиночных стадий развития трематод / Т.А. Гинецинская, А.А. Добровольский, И.В. Оксов // Работы по гельминтологии. – М.: Наука. – 1981. – С. 82-87.
34. Гинецинская, Т.А. Трематоды – их жизненные циклы, биология и эволюция / Т.А. Гинецинская – Л. Наука. – 1968. – 411с.
35. ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». – 2016. – 17 с.
36. Гридасова, Л.Ф. О содержании гликогена у кишечных трихинелл / Л.Ф. Гридасова // Ученые записки. Курский педагогический институт. – 1969. – Т. 59. – С. 69-74.

37. Данченко, Е.О. Новый методический подход к определению концентрации гликогена в тканях и некоторые комментарии по интерпретации результатов / Е.О. Данченко, А.А. Чиркин // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – Т. 3. – С. 25-28.
38. Жохов, А.Е. Два типа церкарий трематоды *Phyllgdistgmum elongatum* (*Fasciolata*, *Gorgoderidae*) из моллюсков *Pisidium amnicum* / А.Е. Жохов // Паразитология. – 1991. – вып. 1. – С. 63-68.
39. Зангинян, А.В. Действие иммуностимулирующего препарата "Эхинацея Гексал" и растительного антигельминтика на систему "паразит-хозяин" при экспериментальном трихинеллезе крыс / А.В. Зангинян // Медицинская наука Армении НАН РА. – 2011. – Т. 51. – №. 2. – С. 79-86.
40. Западнюк, И.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. 3-е издание, переработанное и дополненное / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк – Киев: Вища школа. Головное издательство. – 1983. – 383 с.
41. Иванов, К.П. Жизнь при минимальных расходах энергии / К.П. Иванов // Успехи физиологических наук. – 2008. – Т. 39. – №. 1. – С. 42-54.
42. Извекова, Г.И. Динамика десорбции карбогидраз с поверхности кишечника рыб и паразитирующих в них цестод / Г.И. Извекова // Паразитология. – 1990. – Т. 24. – №. 6. – С. 485-492.
43. Извекова, Г.И. Содержание белка, углеводов и транспорт глюкозы в разных частях стробилы у цестоды *Eubothrium rugosum* / Г.И. Извекова // Паразитология. – 1997. – Т. 31. – вып.1. – С. 90-96.
44. Извекова, Г.И. Транспорт некоторых углеводов у цестоды *Triaenophorus nodulosus* / Г.И. Извекова // Паразитология. – 1989. – Т. 23. – №. 3. – С. 222-228.
45. Извекова, Г.И. Физиологическая специфика взаимоотношений между *Triaenophorus nodulosus* (*Cestoda*) и его хозяевами-рыбами / Г.И. Извекова // Паразитология. – 2001. – Т. 35. – №. 1. – С. 60-68.

46. Кокколова, Л.М. Трихинеллез животных Якутии / Л.М. Кокколова // Наука и образование: современные тренды. Выпуск VI. – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс». – 2014. – С. 14-33.
47. Коняев, С.В. Молекулярно-генетические исследования *Trichinella spp.* в России: первые результаты / С.В. Коняев, А.В. Кривопапов, Т. Янагида, М. Накао, Я. Сако, А. Ито, А.В. Малкина, О.Н. Андреев, В.А. Однокурцев, Н.В. Есаулова, И.В. Середкин, А.Я. Бондарев, Л.В. Ткаченко // Мат. международной науч. конф.: «Современные проблемы общей паразитологии». – Москва. – 2012. – С. 171-174.
48. Маниковская, Н.С. Морфофункциональные особенности передних отделов пищеварительной системы интестинотрематод / Н.С. Маниковская, Л.В. Начева // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2013. – №. 14. – С. 220-222.
49. Мигачева, Л.Д. Рекламации Госагропрома СССР по внедрению достижений науки и практики в производство / Л.Д. Мигачева, Г.А. Котельников // М. - 1987. - №. 6. - С. 85–87.
50. Мусаев, М.Б. Комиссионное и производственное испытание эффективности супрамолекулярного комплекса триклабендазола триклафасцид при фасциолезе крупного рогатого скота / М.Б. Мусаев, М.С. Халиков, М.В. Миленина, А.З. Джамалова, Х.И. Берсанова, И.В. Ирисханов // Российский паразитологический журнал. – 2018. – №. 1. – С. 76-80.
51. Мусаев, М.Б. Комиссионное испытание супрамолекулярного комплекса триклабендазола при фасциолезе овец / М.Б. Мусаев, М.В. Миленина, А.З. Джамалова, Х.И. Берсанова, И.В. Ирисханов, Х-М.М. Мацаев // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2017. – №. 18. – С. 293-296.
52. Напалкова, В.В. Изучение фармакокинетики и остатков триклабендазола в органах и тканях молодняка крупного рогатого скота после однократного перорального введения триклабендазола суспензии 5% / В.В. Напалкова, С.В. Русаков // Ветеринарная практика. – 2008. – №. 4. – С. 52-55.

53. Начева, Л.В. Гистохимические исследования распределения гликогена в органах и тканях *Opisthorchis felineus*, взятых после лечения антигельминтиками / Л.В. Начева, О.И. Бибик, Ю.А. Нестерок // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2010. – №. 11. – С.312-314.

54. Начева, Л.Н. Микроморфологические изменения тканей моллюсков при развитии в них личинок трематод / Л.Н. Начева, Е.А. Сумбаев // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2013. – №. 14. – С. 263-265.

55. Начева, Л.В. Морфология и гистохимия паренхимы трематод / Л.В. Начева // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2015. – №. 16. – С. 288-291.

56. Начева, Л.В. Морфоэкологический анализ и эволюционная динамика тканевых систем трематод, реактивность их органов и тканей при действии антигельминтиков: автореф. дис. ... докт. биол. наук 03.00.20 / Начева Любовь Васильевна. – Москва, 1993. – 57 с.

57. Начева, Л.В. Патоморфология органов и тканей *Opisthorchis felineus* после лечения бильтрицидом золотистых хомяков при экспериментальном описторхозе / Л.В. Начева, О.И. Бибик, Ю.А. Нестерок // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2014. – №. 15. – С. 178-180.

58. Овчарова, Ю.А. Химия углеводов: учебное пособие / Ю.А. Овчарова, И.И. Бочкарева – Майкоп: Изд-во «ИП Кучеренко В.О.», 2019. – 125 с.

59. Пенькова Р.А. Морфологические, биологические и серологические особенности трихинелл и их значение в эпизоотологии трихинеллеза: Автореф. дис. ... канд. вет. наук 03.00.20 / Пенькова Раиса Александровна. – Москва, 1975. – 20 с.

60. Переверзева, Э.В. Динамика морфологических и гистохимических изменений при трихинеллезе, вызванном различными штаммами / Э.В. Переверзева // Мат. докл. Всесоюзной конф. по проблеме трихинеллеза человека и животных. – Вильнюс. – 1972. – С. 58-63.

61. Переверзева, Э.В. К вопросу о штаммовости трихинелл / Э.В. Переверзева // Wiadom. parazytol. – 1966. – Т. 12. – №. 5-6. – С. 531-541.

62. Переверзева, Э.В. Содержание гликогена на разных стадиях развития и инкапсуляции у мышечных трихинелл / Э.В. Переверзева // Мат. к науч. конф. Всесоюзного общества гельминтологов. – Москва. – 1966. – С. 158-160.

63. Постевой, А.Н. Модифицированная методика содержания моллюсков *Lymnaea truncatula* с целью получения адолескариев возбудителя фасциолеза *Fasciola hepatica* / А.Н. Постевой, В.В. Горохов, О.Н. Андрянов, Е.В. Пузанова. – М.: Наука, 2017. – 25 с.

64. Плохинский, Н.А. Математические методы в биологии / Н.А. Плохинский. – М.: МГУ, 1978. – 264 с.

65. Прокофьев, В.В. Влияние температуры и солености воды на продолжительность жизни церкарий морских литоральных трематод *Cryptocotyle sp.*(*Heterophyidae*), *Levinseniella brachysoma* и *Maritrema subdolum* (*Microphallidae*) / В.В. Прокофьев // Паразитология. – 1999. – Т. 33. – №. 6. – С. 520-526.

66. Прокофьев, В.В. Влияние температуры и солености воды на продолжительность жизни церкарий морских литоральных трематод *Podocotyle atomon* (*Opecoelidae*) и *Renicola thaidus* (*Renicolidae*) / В.В. Прокофьев // Паразитология. – 2001. – Т. 35. – №. 1. – С. 69-75.

67. Прокофьев, В.В. Особенности плавания церкарий некоторых видов трематод / В.В. Прокофьев // Паразитология. – 2005. – Т. 39. – №. 3. – С. 250-261.

68. Рабинович, В.А. Краткий химический справочник / В.А. Рабинович, З.Я. Хавин. – Л.: Химия, 1977. – 72 с.

69. РД-АПК 3.10.07.02-09 «Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений». – 2009. – 29 с.

70. Рипатти, П.О. Жирные кислоты трихинелл / П.О. Рипатти, В.А. Бритов // Паразитология. – 1991. – Т. 25. – №. 5. – С. 450-455.

71. Розенфельд, Е.Л. Врожденные нарушения обмена гликогена / Е.Л. Розенфельд, И.А. Попова. – Медицина, 1989. – 240с.

72. Северин, Е.С. Биологическая химия с упражнениями и задачами: учебник / под ред. чл.-корр. РАН С.Е. Северина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 624 с.
73. Скворцова, Ф.К. Диагностика трихинеллеза на ранних стадиях развития личинок / Ф.К. Скворцова, А.В. Успенский // Российский паразитологический журнал. – М., 2016. – Т.35. – Вып. 1. – С. 58-66.
74. Скворцова, Ф.К. Методика определения жизнеспособности личинок *Trichinella spiralis* и *T. pseudospiralis* / Ф.К. Скворцова, О.Н. Андреев, Л.А. Гребенкина. – М.: ВИГИС, 2009. – 8 с.
75. Скворцова, Ф.К. Резистентность к низким температурам изолятов трихинелл как признак характеристики видов / Ф.К. Скворцова // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2009. – №. 10. – С. 374-376.
76. Скворцова, Ф.К. Резистентность к низким температурам трихинелл от лисицы обыкновенной / Ф.К. Скворцова, О.Н. Андреев // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2009. – №. 10. – С. 377-379.
77. Скворцова, Ф.К. *Trichinella pseudospiralis* у свиней в Камчатском крае / Ф.К. Скворцова // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2012. – №. 13. – С. 388-389.
78. Скрябин, К.И. Метод полных гельминтологических вскрытий позвоночных, включая человека / К.И. Скрябин – Москва. – Изд-во 1-го МГУ. – 1928. – 45 с.
79. Соколина, Ф.М. Структура покровов *Fasciola hepatica* Linneus, 1758 в электронном сканирующем микроскопе / Ф.М. Соколина, Л.М. Ситдикова, В.Г. Изотов // Российский паразитологический журнал. – 2009. – №. 3. – С. 19-25.
80. Соколина, Ф.М. Формирование желточных клеток трематоды *Fasciola hepatica* Linneus, 1758 / Ф.М. Соколина, И.И. Рахимов, Г. Игнатьев // Теория и практика паразитарных болезней животных. – 2012. – №. 13. – С.390-392.
81. Стражник, Л.В. О роли повышенных температур в жизнедеятельности некоторых цестод рыб / Л.В. Стражник, О.Н. Давыдов // Паразитология. – 1975. – Т. 9. - №. 1. – С. 37-46.

82. Тимонов, Е.В. Люминесцентное-микроскопическое исследование морфогенеза, миграции и питания трихинелл: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук 03.00.20 / Тимонов Евгений Владимирович. – Москва, 1970. – 22 с.
83. Тимонов, Е.В. Прижизненное исследование морфогенеза кишечных трихинелл методом люминесценции / Е.В. Тимонов // Паразитология. – 1970. – №. 3. – С. 237-242.
84. Тимонов, Е.В. Способ питания трихинеллы как ведущий фактор адаптации к организму млекопитающих / Е.В. Тимонов, Л.В. Силакова // Паразитология. – 1976. – №. 6. – С. 506-513.
85. Тимофеева, Т.А. Продолжительность жизни морских цистофорных церкарий во внешней среде / Т.А. Тимофеева // Паразитология. – 1978. – Т. 12. – №. 4. – С. 333-338.
86. Яворский, И.П. Запасные питательные вещества трематоды *Fasciola hepatica* на разных стадиях ее онтогенеза / И.П. Яворский // Паразитология. – 1988. – №. 3. – С. 258-262.
87. Alonso, M.D. A new look at the biogenesis of glycogen / M.D. Alonso, J. Lomako, W.M. Lomako, W.J. Whelan // The FASEB journal. – 1995. – V. 9. – №. 12. – P. 1126-1137.
88. Alvarez-Bujidos, M.L. Pharmacokinetics of triclabendazole in rabbits / M.L. Alvarez-Bujidos, A.I. Ortiz, A. Negro, J.C. Cubría, D. Ordóñez // Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology. – 1993. – V. 106. – №. 3. – P. 805.
89. An, C.L. Histological and histochemical observation of the effect of Mebendazoli compositae [sic] against encysted larvae of *Trichinella spiralis* in mice / C.L. An // Chinese Journal of Parasitic Disease Control. – 1990. – V. 3. – №. 2. – P. 133-135.
90. Ankeny, R.A. The natural history of *Caenorhabditis elegans* research / R.A. Ankeny // Nature Reviews Genetics. – 2001. – V. 2. – №. 6. – P. 474-479.

91. Anderson, R.M. Survival characteristics of the free-living cercarial population of the ectoparasitic digenean *Transversotrema patialensis* (Soparker, 1924) / R.M. Anderson, P.J. Whitfield // *Parasitology*. – 1975. – V. 70. – №. 3. – P. 295-310.
92. Andrews, S.J. The life cycle of *Fasciola hepatica* / S.J. Andrews // *Fasciolosis*. – 1999. – V. 1. – P. 1-30.
93. Ankeny, R.A. The natural history of *Caenorhabditis elegans* research / R.A. Ankeny // *Nature Reviews Genetics*. – 2001. – V. 2. – №. 6. – P. 474-479.
94. Aukštikalnienė, R. Histochemical investigations of glycogen deposits in the tissues of *Toxocora canis* and their changes after the influence of pyrantel pamoate and albendazole in vivo / R. Aukštikalnienė, O. Kublickienė // *Acta Zoologica Lituanica*. – 2000. – V. 10. – №. 2. – P. 85-92.
95. Baqui, A. Histochemical changes in *Setaria cervi* caused by certain anthelmintics / A. Baqui, H. Khatoon // *Proceedings: Animal Sciences*. – 1982. – V. 91. – №. 2. – P. 135-141.
96. Barrett, J. *Biochemistry of parasitic helminthes* / J. Barrett. – MacMillan Publishers Ltd., 1981. – 308 p.
97. Barry, D.H. Enzyme histochemistry of the adult liver fluke, *Fasciola hepatica* / D.H. Barry, L.E. Mawdesley-Thomas, J.C. Malone // *Experimental Parasitology*. – 1968. – V. 23. – №. 3. – P. 355-360.
98. Beckett, E.B. The histochemistry and electron microscopy of glycogen in the larva of *Trichinella spiralis* and its environment / E.B. Beckett, B. Boothroyd // *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. – 1962. – V. 56. – №. 3. – P. 264-273.
99. Behm, C.A. Anthelmintic action—a metabolic approach (a review) / C.A. Behm, C. Bryant // *Veterinary Parasitology*. – 1979. – V. 5. – №. 1. – P. 39-49. (321)
100. Behm, C.A. Phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Fasciola hepatica* / C.A. Behm, C. Bryant // *International journal for parasitology*. – 1982. – V. 12. – №. 4. – P. 271-278.
101. Behm, C.A., Regulatory properties of a partially purified preparation of pyruvate kinase from *Fasciola hepatica* / C.A. Behm, C. Bryant // *International journal for parasitology*. – 1980. – V. 10. – №. 2. – P. 107-114.

102. Bendayan, M. Association of AMP-activated protein kinase subunits with glycogen particles as revealed in situ by immunoelectron microscopy / M. Bendayan, I. London, B.E. Kemp, G.D. Hardie, N. Ruderman, M. Prentki // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. – 2009. – V. 57. – №. 10. – P. 963-971.

103. Beshay, E.V.N. Therapeutic efficacy of *Artemisia absinthium* against *Hymenolepis nana*: in vitro and in vivo studies in comparison with the anthelmintic praziquantel / E.V.N. Beshay // *Journal of helminthology*. – 2018. – V. 92. – №. 3. – P. 298-308.

104. Boczon, K. The tricarboxylic acid cycle and pentose pathway enzymes in *T. spiralis* larvae / K. Boczon // *Wiadomości Parazytologiczne*. – 1974. – V. 20. – №. 1. – P. 29-39.

105. Boray, J.C. Laboratory studies on the survival and infectivity of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* metzceicariae / J.C. Boray, K. Enigk // *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*. – 1964. – V. 15. – №. 3. – P. 324-331.

106. Borgers, M. Ultrastructural changes in *Ascaris suum* intestine after mebendazole treatment in vivo / M. Borgers, S. De Nollin // *The Journal of parasitology*. – 1975. – P. 110-122.

107. Boyunaga, H. *Fasciola hepatica* miracidia are dependent on respiration and endogenous glycogen degradation for their energy generation / H. Boyunaga, M.G.J. Schmitz, J.F.H.M. Brouwers, J.J. Van Hellemond, A.G.M. Tielens // *Parasitology*. – 2001. – V. 122. – №. 2. – P. 169.

108. Brouwers, J. Adaptations in the lipid and energy metabolism of parasitic helminthes / J. Brouwers, J.J. Van Hellemond, A.G.M. Tielens // *Netherlands Journal of Zoology*. – 1996. – №. 3-4. – P. 206-215.

109. Bryant, C. Some aspects of the metabolism of the liver fluke, *Fasciola hepatica* / C. Bryant, J.P.G. Williams // *Experimental Parasitology*. – 1962. – V. 12. – №. 5. – P. 372-376.

110. Buchanan, J.F. *Fasciola hepatica*: surface and internal tegumental changes induced by treatment in vitro with the sulphoxide metabolite of albendazole ('Valbazen')

/ J.F. Buchanan, I. Fairweather, G.P. Brennan, A. Trudgett, E.M. Hoey // *Parasitology*. – 2003. – V. 126. – №. 2. – P. 141.

111. Byerly, L. The life cycle of nematode *Caenorhabditis elegans*: I. Wild-type growth and reproduction / L. Byerly, R.C. Cassada, R.L. Russell // *Developmental biology*. – 1976. – V.51. – №. 1. – P. 23-33.

112. Castro G.A. Carbohydrates and lipids in *Trichinella spiralis* larvae and their utilization in vitro / G.A. Castro, D. Fairbairn // *The Journal of parasitology*. – 1969. – V. 55. – №. 1. – P. 51-58.

113. Chadee, K. Designation and freezing resistance of isolates of *Trichinella spiralis* from wild carnivores / K. Chadee, T.A. Dick // *Journal of Wildlife Diseases*. – 1982. – V. 18. – №. 2. – P. 169-173.

114. Chen, X. Morphological, histological and histochemical observations on the effect of albendazole on encysted larvae of *Trichinella spiralis* in mice / X. Chen, P. Chen, F. Ji, Y. Wang, F. Wang // *Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*. – 1999. – V. 17. – №. 3. – P. 152-154.

115. Cherkas, A. Label-free molecular mapping and assessment of glycogen in *C. elegans* / A. Cherkas, A. S. Mondol, J. Rüger, N. Urban, J. Popp, L.O. Klotz, I.W. Schie // *Analyst*. – 2019. – V. 144. – №. 7. – P. 2367-2374.

116. Clark, P.S. Bear meat trichinosis: epidemiologic, serologic, and clinical observations from two Alaskan outbreaks / P.S. Clark, K.M. Brownsberger, A.R. Saslow, I.G. Kagan, G.R. Noble, J.E. Maynard // *Annals of internal medicine*. – 1972. – V. 76. – №. 6. – P. 951-956.

117. Coles, G.C. Anthelmintic activity of triclabendazole / G.C. Coles // *Journal of Helminthology*. – 1986. – V. 60. – №. 3. – P. 210-212.

118. Cooper Jr, A.F. Metabolism of glycogen and neutral lipids by *Aphelenchus avenae* and *Caenorhabditis sp.* in aerobic, microaerobic and anaerobic environments / A.F. Cooper Jr, S.D. Van Gundy // *Journal of nematology*. – 1970. – V. 2. – №. 4. – P. 305.

119. Cornford, E.M. Glucose utilization rates are linked to the internal free glucose gradient in the rat tapeworm / E.M. Cornford // *Experimental parasitology*. – 1990. – V. 70. – №. 1. – P. 25-34.

120. Cornish, R.A. Changes in energy metabolism due to anthelmintics in *Fasciola hepatica* maintained in vitro / R.A. Cornish, C. Bryant // *International Journal for Parasitology*. – 1976. – V. 6. – №. 5. – P. 393-398.

121. Cornish, R.A. The in vivo effects of rafoxanide on the energy metabolism of *Fasciola hepatica* / R.A. Cornish, C.A. Behm, R.W. Butler, C. Bryant // *International journal for parasitology*. – 1977. – V. 7. – №. 3. – P. 217-220.

122. Cumino, A.C. Flubendazole interferes with a wide spectrum of cell homeostatic mechanisms in *Echinococcus granulosus* protoscoleces / A.C. Cumino, M.C. Elissondo, G.M. Denegri // *Parasitology international*. – 2009. – V. 58. – №. 3. – P. 270-277.

123. Cyr, D. *Hymenolepis diminuta*: uptake of 5-hydroxytryptamine (serotonin), glucose, and changes in worm glycogen levels / D. Cyr, S. Gruner, D.F. Mettrick // *Canadian Journal of Zoology*. – 1983. – V. 61. – №. 7. – P. 1469-1474.

124. Cwiklinski, K. Infection by the helminth parasite *Fasciola hepatica* requires rapid regulation of metabolic, virulence, and invasive factors to adjust to its mammalian host / K. Cwiklinski, H. Jewhurst, P. McVeigh, T. Barbour, A.G. Maule, J. Tort, J.P. Dalton // *Molecular & Cellular Proteomics*. – 2018. – V. 17. – №. 4. – P. 792-809.

125. Davidson, R.K. High tolerance to repeated cycles of freezing and thawing in different *Trichinella nativa* isolates / R.K. Davidson, K. Handeland, C.M.O. Kapel // *Parasitology research*. – 2008. – V. 103. – №. 5. – P. 1005-1010.

126. Delatour, P. Species differences in the generation of the chiral sulfoxide metabolite of albendazole in sheep and rats / P. Delatour, E. Benoit, M. Caude, A. Tambute // *Chirality*. – 1990. – V. 2. – №. 3. – P. 156-160.

127. De Nollin, S. Biochemical effects of mebendazole on *Trichinella spiralis* larvae / S. De Nollin, H. Van den Bossche // *The Journal of parasitology*. – 1973. – V. 59. – №. 6. – P. 970-976.

128. De Nollin, S. Effects of mebendazole on the encysted phase of *Trichinella spiralis* in the rat: an electron-microscope study / S. De Nollin, M. Borgers, O. Vanparijs, H. van den Bossche // *Parasitology*. – 1974. – V. 69. – P. 55-62.
129. Devos, P. The alpha particulate liver glycogen. A morphometric approach to the kinetics of its synthesis and degradation / P. Devos, P. Baudhuin, F. Van Hoof, H.G. Hers // *Biochemical Journal*. – 1983. – V. 209. – №. 1. – P. 159-165.
130. Dey, P. Effect of *Lysimachia ramosa* Wall. Ex Duby and its n-butanol fraction on glycogen content and some energy related enzymes in the cestode, *Raillietina echinobothrida* / P. Dey, B. Roy // *Proceedings of the Zoological Society*. – Springer India. – 2020. – P. 1-10.
131. Dick, T.A. Observations on a *Trichinella spiralis* isolate from a polar bear / T.A. Dick, M. Belosevic // *The Journal of parasitology*. – 1978. – V. 64. – №. 6. – P. 1143-1145.
132. Dies, K. Survival of *Trichinella spiralis* larvae in deep-frozen wolf tissue / K. Dies // *The Canadian Veterinary Journal*. – 1980. – V. 21. – №. 2. – P. 38.
133. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes / *Official Journal of the European Union*, L 276. – 2010. – V. 53. – P. 33-79.
134. Dubey, A.K. Benzimidazoles in a wormy world / A.K. Dubey, P.K. Sanyal // *Vet. Scan. Online Veterinary Medical Journal*. – 2010. – V. 5. – №. 2. – P. 63.
135. Fairbairn, D. Biochemistry of normal and irradiated strains of *Hymenolepis diminuta* / D. Fairbairn, G. Wertheim, R.P. Harpur, E.L. Schiller // *Experimental Parasitology*. – 1961. – V. 11. – №. 2-3. – P. 248-263.
136. Ferguson, J.D. Metabolism of intestinal stages of *Trichinella spiralis* / J.D. Ferguson, G.A. Castro // *American Journal of Physiology-Legacy Content*. – 1973. – V. 225. – №. 1. – P. 85-89.
137. Ferrer, J.C. Control of glycogen deposition / J.C. Ferrer, C. Favre, R.R. Gomis, J.M. Fernández-Novell, M. García-Rocha, N. de la Iglesia, J.J. Guinovart // *FEBS letters*. – 2003. – V. 546. – №. 1. – P. 127-132.

138. Fornelio, A.C. The mode of action of some benzimidazole drugs on *Trichinella spiralis* / A.C. Fornelio, F.R. Caabeiro, A.J. Gonzalez // Parasitology. – 1987. – V. 95. – №. 1. – P. 61-70.

139. Furmaga, S. The behaviour of certain biochemical indicators in experimental sheep fasciolosis / S. Furmaga, J.L. Gundlach // Acta Parasit. Pol. – 1972. – V. 20. – №. 47. – P. 539-550.

140. Goldberg, E. Studies on the intermediary metabolism of *Trichinella spiralis* / E. Goldberg // Experimental parasitology. – 1957. – V. 6. – №. 4. – P. 367-382.

141. Greenberg, C.C. Glycogen branches out: new perspectives on the role of glycogen metabolism in the integration of metabolic pathways / C.C. Greenberg, M.J. Jurczak, A.M. Danos, M.J. Brady // American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 2006. – V. 291. – №. 1. – P. E1-E8.

142. Gupta, A. Glycogen content and in vitro glycogen consumption in sheep cestode *Moniezia expansa* (Rudolphi, 1805) / A. Gupta, V. Gupta // Bulletin of Pure & Applied Sciences-Zoology. – 2020. – V. 39A. – №. 1. – P. 200-205.

143. Gusarov, I. Glycogen at the crossroad of stress resistance, energy maintenance, and pathophysiology of aging / I. Gusarov, E. Nudler // BioEssays. – 2018. – V. 40. – №. 9. – P. 1800033.

144. Halton, D.W. Glycogen utilisation and deposition in flatworm parasites / D.W. Halton // Practical Exercises in Parasitology. – 2001. – P. 201-208.

145. Hanna, R. *Fasciola hepatica*: histology of the reproductive organs and differential effects of triclabendazole on drug-sensitive and drug-resistant fluke isolates and on flukes from selected field cases / R. Hanna // Pathogens. – 2015. – V. 4. – №. 3. – P. 431-456.

146. Harder, A. Praziquantel impairs the ability of exogenous serotonin to stimulate carbohydrate metabolism in intact *Schistosoma mansoni* / A. Harder, J. Abbink, P. Andrews, H. Thomas // Parasitology research. – 1987. – V. 73. – №. 5. – P. 442-445.

147. Harder, A. The biochemistry of *Haemonchus contortus* and other parasitic nematodes / A. Harder // Advances in parasitology. – 2016. – V. 93. – P. 69-94.

148. Hosono, R. Life span of the wild and mutant nematode *Caenorhabditis elegans*: effects of sex, sterilization, and temperature / R. Hosono, Y. Mitsui, Y. Sato, S. Aizawa, J. Miwa // *Experimental gerontology*. – 1982. – V. 17. – №. 2. – P. 163-172.
149. Humiczewska, M. Oxidative enzymes in the development of *Fasciola hepatica* L. II. Dehydrogenase activity of miracidium / M. Humiczewska // *Folia histochemica et cytochemica*. – 1975. – V. 13. – №. 1-2. – P. 37-50.
150. Jurczak, M.J. The role of protein translocation in the regulation of glycogen metabolism / M.J. Jurczak, A.M. Danos, V.R. Rehrmann, M.J. Brady // *Journal of cellular biochemistry*. – 2008. – V. 104. – №. 2. – P. 435-443.
151. Kane, H.J. Metabolic studies on the new fasciolicidal drug, closantel / H.J. Kane, C.A. Behm, C. Bryant // *Molecular and biochemical parasitology*. – 1980. – V. 1. – №. 6. – P. 347-355.
152. Kapel, C.M.O. Freeze tolerance, morphology, and RAPD-PCR identification of *Trichinella nativa* in naturally infected arctic foxes / C.M.O. Kapel, E. Pozio, L. Sacchi, P. Prestrud // *The Journal of parasitology*. – 1999. – P. 144-147.
153. Keiser, J. Triclabendazole for the treatment of fascioliasis and paragonimiasis / J. Keiser, D. Engels, G. Büscher, J. Utzinger // *Expert opinion on investigational drugs*. – 2005. – V. 14. – №. 12. – P. 1513-1526.
154. Kendall, S.B. The chemotherapy of fascioliasis / S.B. Kendall, J.W. Parfitt // *British Veterinary Journal*. – 1962. – V. 118. – №. 1. – P. 1-10.
155. Kilgore, M.W. Chemical composition of newborn larvae, muscle larvae and adult *Trichinella spiralis* / M.W. Kilgore, G.L. Stewart, M. Lou // *International journal for parasitology*. – 1986. – V. 16. – №. 5. – P. 455-460.
156. Kimura, S. Viability of *Fasciola gigantica* metacercariae / S. Kimura, A. Shimizu // *The Japanese journal of veterinary science*. – 1978. – V. 40. – №. 3. – P. 357-359.
157. Klass, M.R. Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span / M.R. Klass // *Mechanisms of ageing and development*. – 1977. – V. 6. – P. 413-429.

158. Komuniecki, P.R. Biochemical changes during the aerobic-anaerobic transition in *Ascaris suum* larvae / P.R. Komuniecki, L. Vanover // Molecular and biochemical parasitology. – 1987. – V. 22. – №. 2-3. – P. 241-248.
159. Komuniecki, P.R. The effect of levamisole on glycogen synthase and the metabolism of *Litomosoides carinii* / P.R. Komuniecki, H.J. Saz // The Journal of parasitology. – 1982. – P. 221-227.
160. Komuniecki, R. Carbohydrate and energy metabolism in parasitic helminths / R. Komuniecki, A.G.M. Tielens // Molecular medical parasitology. – Academic Press, 2003. – P. 339-358.
161. Kozar, L., Histochemical examinations in different developmental forms of *Trichinella spiralis* / L. Kozar, R. Seniuta // Wiadom Parazytolog. – 1974. – V. 20. – №. 1. – P. 41-47.
162. Kozar, Z. Histochemical study of drug effects on mice infected with *Trichinella spiralis* / Z. Kozar, J. Zarzycki, R. Seniuta, T. Martynowicz // Experimental parasitology. – 1967. – V. 21. – №. 2. – P. 173-185.
163. Kozar, Z. Histochemische untersuchungen über die darmphase der trichinellose bei weißen mäusen / Z. Kozar, J. Zarzycki, R. Seniuta, T. Martynowicz // Zeitschrift für Parasitenkunde. – 1966. – V. 27. – №. 2. – P. 106-126.
164. Köhler, P. The strategies of energy conservation in helminths / P. Köhler // Molecular and biochemical parasitology. – 1985. – V. 17. – №. 1. – P. 1-18.
165. Krisman, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine / C.R. Krisman // Analytical biochemistry. – 1962. – V. 4. – №. 1. – P. 17-23.
166. Lacey, E. Mode of action of benzimidazoles / E. Lacey // Parasitology Today. – 1990. – V. 6. – №. 4. – P. 112-115.
167. LaMacchia, J.C. Glycogen fuels survival during hyposmotic-anoxic stress in *Caenorhabditis elegans* / J.C. LaMacchia, H.N. Frazier, M.B. Roth // Genetics. – 2015. – V. 201. – №. 1. – P. 65-74.
168. Leclair, D. A preliminary investigation on the infectivity of *Trichinella larvae* in traditional preparations of walrus meat / D. Leclair, L.B. Forbes, S. Suppa, J.F. Proulx, A.A. Gajadhar // Parasitology research. – 2004. – V. 93. – №. 6. – P. 507-509.

169. Lee, D.L. The Physiology of Nematodes / D.L. Lee // Molteno Institute of Biology and Parasitology. – Cambridge. – 1965. – №. 3. – P. 1-154.
170. Li, Q.Z. The target of benzimidazole carbamate against cysticerci cellulosa / Q.Z. Li, Y.H. Hao, X.J. Gao, W.X. Gao, Z.H.A.O. Bing // Agricultural Sciences in China. – 2007. – V. 6. – №. 8. – P. 1009-1017.
171. Lipkowitz, K.B. Molecular modeling: a tool for predicting anthelmintic activity in vivo / K.B. Lipkowitz, R.O. McCracken // Parasitology research. – 1993. – V. 79. – №. 6. – P. 475-479.
172. Lloyd, G.M. A fructose biphosphate activated lactate dehydrogenase in the liver fluke *Fasciola hepatica* / G.M. Lloyd // Molecular and biochemical parasitology. – 1983. – V. 7. – №. 3. – P. 237-246.
173. Lloyd, G.M. Energy metabolism and its regulation in the adult liver fluke *Fasciola hepatica* / G.M. Lloyd // Parasitology. – 1986. – V. 93. – №. 1. – P. 217-248.
174. Lloyd, G.M. *Fasciola hepatica*: carbohydrate metabolism of the adult / G.M. Lloyd, J. Barrett // Experimental parasitology. – 1983. – V. 56. – №. 1. – P. 81-88.
175. Lomako, J. Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis / J. Lomako, W.M. Lomako, W.J. Whelan // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. – 2004. – V. 1673. – №. 1. – P. 45-55.
176. Lomako, J. Proglycogen: a low-molecular-weight form of muscle glycogen / J. Lomako, W.M. Lomako, W.J. Whelan // FEBS letters. – 1991. – V. 279. – №. 2. – P. 223-228.
177. Malakauskas, A. Tolerance to low temperatures of domestic and sylvatic *Trichinella spp.* in rat muscle tissue / A. Malakauskas, C.M.O. Kapel // Journal of Parasitology. – 2003. – V. 89. – №. 4. – P. 744-748.
178. Mansour, T.E. Biochemical effects of lysergic acid diethylamide on the liver fluke *Fasciola hepatica* / T.E. Mansour, D.B. Stone // Biochemical Pharmacology. – 1970. – V. 19. – P. 1137-1146.
179. Mansour, T.E. Effects of serotonin (5-hydroxytrypta-mine) and adenosine 3', 5'-phosphate on phosphofructokinase from the liver fluke, *Fasciola hepatica* / T.E.

Mansour, J.M. Mansour // Journal of Biological Chemistry. – 1962. – V. 237. – №. 3. – P. 629-634.

180. Mansour, T.E. Studies on the carbohydrate metabolism of the liver fluke *Fasciola hepatica* / T.E. Mansour // Biochim. Biophys. Acta. – 1959. – V.34. – P. 456-464.

181. Mansour, T.E. The effect of serotonin and related compounds on the carbohydrate metabolism of the liver fluke, *Fasciola hepatica* / T.E. Mansour // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 1959. – V. 126. – №. 3. – P. 212-216.

182. Mansour, T.E. The effect of serotonin (5-hydroxytryptamine) on the formation of adenosine 3', 5'-phosphate by tissue particles from the liver fluke, *Fasciola hepatica* / T.E. Mansour, E.W. Sutherland, T.W. Rall, E. Bueding // Journal of Biological Chemistry. – 1960. – V. 235. – №. 2. – P. 466-470.

183. Meléndez, R. The fractal structure of glycogen: a clever solution to optimize cell metabolism / R. Meléndez, E. Meléndez-Hevia, E.I. Canela // Biophysical journal. – 1999. – V. 77. – №. 3. – P. 1327-1332.

184. Melendez-Hevia, E. Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule / E. Melendez-Hevia, T.G. Waddell, E.D. Shelton // Biochemical Journal. – 1993. – V. 295. – №. 2. – P. 477-483.

185. Mestorino, N. Pharmacokinetic disposition of triclabendazole in cattle and sheep; discrimination of the order and the rate of the absorption process of its active metabolite triclabendazole sulfoxide / N. Mestorino, E.A. Formentini, M.F. Lucas, C. Fernandez, P. Modamio, E.M. Hernández, J.O. Errecalde // Veterinary research communications. – 2008. – V. 32. – №. 1. – P. 21-33.

186. McBride, A. The glycogen-binding domain on the AMPK β subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor / A. McBride, S. Ghilagaber, A. Nikolaev, D.G. Hardie // Cell metabolism. – 2009. – V. 9. – №. 1. – P. 23-34.

187. McCracken, R.O. Biochemical effects of thiabendazole and cambendazole on *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) in vivo / R.O. McCracken, D.D. Taylor // The Journal of parasitology. – 1983. – P. 295-301.

188. McCracken, R.O. Structure-activity relationships of benzothiazole and benzimidazole anthelmintics: a molecular modeling approach to in vivo drug efficacy / R.O. McCracken, K.B. Lipkowitz // *The Journal of parasitology*. – 1990. – P. 853-864.

189. Moczon, T. *Schistosoma haematobium*: histochemistry of glycogen, glycogen phosphorylase a and glycogen branching enzyme in niridazole-treated females / T. Moczon, Z. Swiderski // *International journal for parasitology*. – 1992. – V. 22. – №. 1. – P. 55-63.

190. Montgomery, R. Determination of glycogen / R. Montgomery // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1957. – V. 67. – P. 378-386.

191. Moore, M.N. A histochemical study of the rediae and cercariae of *Fasciola hepatica* / M.N. Moore, D.W. Halton // *Zeitschrift für Parasitenkunde*. – 1975. – V. 47. – №. 1. – P. 45-54.

192. Morris, D.L. Colorimetric determination of glycogen. Disadvantages of the iodine method / D.L. Morris // *Journal of Biological Chemistry*. – 1946. – V. 166. – P. 199-203.

193. Moss, G.D. The excretory metabolism of the endoparasitic digenean *Fasciola hepatica* and its relationship to its respiratory metabolism / G.D. Moss // *Parasitology*. – 1970. – V. 60. – №. 1. – P. 1-19.

194. Odoevskaya, I.M. The peculiarities of trichinellosis epidemiology in the Arctic territories of the Far Eastern Federal District of Russia / I.M. Odoevskaya, A.V. Uspensky, I.V. Seredkin, L.A. Bukina // *14th International Conference on Trichinellosis*. – 2015. – P. 141-141.

195. Oropeza, D.L. Hematoma hepático subcapsular por fasciola / D.L. Oropeza, J.A. Escobedo, M.V. Vásquez, R.A. Gonzaga, M.S. Mercado // *Revista de Gastroenterología del Perú*. – 2003. – V. 23. – №. 2. – P. 142-148.

196. Owen, I.L. Survival of *Trichinella papuae* muscle larvae in a pig carcass maintained under simulated natural conditions in Papua New Guinea / I.L. Owen, S.A. Reid // *Journal of helminthology*. – 2007. – V. 81. – №. 4. – P. 429-432.

197. Oxberry, M.E. Evaluation of the effects of albendazole and metronidazole on the ultrastructure of *Giardia duodenalis*, *Trichomonas vaginalis* and *Spiroplasma*

muris using transmission electron microscopy / M.E. Oxberry, R.C.A. Thompson, J.A. Reynoldson // International journal for parasitology. – 1994. – V. 24. – №. 5. – P. 695-703.

198. Pantelouris, E.M. Localization of glycogen in *Fasciola hepatica* L. and an effect of insulin / E.M. Pantelouris // Journal of helminthology. – 1964. – V. 38. – №. 3-4. – P. 283-286.

199. Peihui, C. Histochemical observation on the effects of albendazole and mebendazole on *Cysticercus cellulosae* in vitro / C. Peihui, Y. Jin, W. Xiuqin, L. Shaojie, W. Fenyun // Journal of Capital University of Medical Sciences. – 1996. – V. 1. – P. 135-140.

200. Pérez-Serrano, J. The effects of albendazole and albendazole sulphoxide combination-therapy on *Echinococcus granulosus* in vitro / J. Pérez-Serrano, N. Casado, F. Rodriguez-Caabeiro // International journal for parasitology. – 1994. – V. 24. – №. 2. – P. 219-224.

201. Pfleiderer, G. Glycogen: Determination as d-glucose with hexokinase, pyruvic kinase and lactic dehydrogenase / G. Pfleiderer // Methods of enzymatic analysis. – Academic Press, 1965. – P. 59-62.

202. Pozio, E. Adaptation of *Trichinella spp.* for survival in cold climates / E. Pozio // Food and Waterborne Parasitology. – 2016. – V. 4. – P. 4-12.

203. Pozio, E. Molecular Detection of Foodborne Pathogens / E. Pozio, G. La Rosa // CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton. – 2010. – P. 851–863.

204. Prats, C. Phosphorylation-dependent translocation of glycogen synthase to a novel structure during glycogen resynthesis / C. Prats, J.A. Cadefau, R. Cussó, K. Qvortrup, J.N. Nielsen, J.F. Wojtaszewki, T. Ploug // Journal of Biological Chemistry. – 2005. – V. 280. – №. 24. – P. 23165-23172.

205. Preet, S. Anthelmintic effect of biofabricated silver nanoparticles using *Ziziphus jujuba* leaf extract on nutritional status of *Haemonchus contortus* / S. Preet, R.S. Tomar // Small Ruminant Research. – 2017. – V. 154. – P. 45-51.

206. Prichard, R.K. A comparative study of the tricarboxylic acid cycle enzymes in *Fasciola hepatica* and rat liver / R.K. Prichard, P.J. Schofield // Comparative Biochemistry and Physiology. – 1968. – V. 25. – №. 3. – P. 1005-1019.

207. Prichard, R.K. Mode of action of the anthelmintic thiabendazole in *Haemonchus contortus* / R.K. Prichard // Nature. – 1970. – V. 228. – №. 5272. – P. 684-685.

208. Prichard, R.K. The glyoxylate cycle, fructose-1, 6-diphosphatase and glyconeogenesis in *Fasciola hepatica* / R.K. Prichard, P.J. Schofield // Comparative Biochemistry and Physiology. – 1969. – V. 29. – №. 2. – P. 581-590.

209. Prichard, R.K. The metabolic profile of adult *Fasciola hepatica* obtained from rafoxanide-treated sheep / R.K. Prichard // Parasitology. – 1978. – V. 76. – №. 3. – P. 277-288.

210. Prichard, R.K. The role and inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Fasciola hepatica* (Trematoda) / R.K. Prichard // The role and inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Fasciola hepatica* (Trematoda). – 1980. – P. 315-324.

211. Rahman, M.S. Metabolic changes in some helminths from sheep treated with mebendazole / M.S. Rahman, R.A. Cornish, R.A.F. Chevis, C. Bryant // New Zealand veterinary journal. – 1977. – V. 25. – №. 4. – P. 79-83.

212. Rahman, M.S. Studies of regulatory metabolism in *Moniezia expansa*: effects of cambendazole and mebendazole / M.S. Rahman, C. Bryant // International Journal for Parasitology. – 1977. – V. 7. – №. 5. – P. 403-409.

213. Ramp, T. Glucose and pyruvate catabolism in *Litomosoides carinii* / T. Ramp, P. Köhler // Parasitology. – 1984. – V. 89. – №. 2. – P. 229-244.

214. Rew, R.S. The carbohydrate metabolism of *Brugia pahangi* microfilariae / R.S. Rew, H.J. Saz // The Journal of parasitology. – 1977. – P. 123-129.

215. Roach, P.J. Glycogen and its metabolism / P.J. Roach // Current molecular medicine. – 2002. – V. 2. – №. 2. – P. 101-120.

216. Roach, P.J. Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis / P.J. Roach, A.V. Skurat // Progress in nucleic acid research and molecular biology. – 1997. – V. 57. – P. 289.

217. Rossi, L. The subnivium, a haven for *Trichinella larvae* in host carcasses / L. Rossi, M. Interisano, G. Deksne, E. Pozio // International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. – 2019. – V. 8. – P. 229-233.

218. Ryu, J.H., Comparative structural analyses of purified glycogen particles from rat liver, human skeletal muscle and commercial preparations / J.H. Ryu, J. Drain, J.H. Kim, S. McGee, A. Gray-Weale, L. Waddington, D. Stapleton // International journal of biological macromolecules. – 2009. – V. 45. – №. 5. – P. 478-482.

219. Sarwal, R. Effect of benzimidazole drugs on the uptake of low molecular weight nutrients in *Trichuris globulosa* / R. Sarwal, S.N. Sanyal, S. Khera // International journal for parasitology. – 1992. – V. 22. – №. 1. – P. 9-14.

220. Saz, H.J. Energy metabolisms of parasitic helminths: adaptations to parasitism / H.J. Saz // Annual Review of Physiology. – 1981. – V. 43. – №. 1. – P. 323-341.

221. Schiller, E.L. Aerobic and anaerobic carbohydrate metabolism and egg production of *Schistosoma mansoni* in vitro / E.L. Schiller, E. Bueding, V.M. Turner, J. Fisher // Parasitology. – 1975. – №. 61. – P. 385-89.

222. Seifter, S. The estimation of glycogen with the anthrone reagent / S. Seifter, S. Dayton, B. Novic, E. Muntwyler // Arch. Biochem. – 1950. – V. 25. – P. 191-200.

223. Seo, Y. Metabolic shift from glycogen to trehalose promotes lifespan and healthspan in *Caenorhabditis elegans* / Y. Seo, S. Kingsley, G. Walker, M.A. Mondoux, H.A. Tissenbaum // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – V. 115. – №. 12. – P. E2791-E2800.

224. Shearer, J. New perspectives on the storage and organization of muscle glycogen / J. Shearer, T.E. Graham // Canadian journal of applied physiology. – 2002. – V. 27. – №. 2. – P. 179-203.

225. Sleckman, B.P. Glycogen and protein content in adult *Echinostoma revolutum* (Trematoda) / B.P. Sleckman, B. Fried // Proceedings of the Helminthological Society of Washington. – 1984. – V. 51. – №. 2. – P. 355-356.

226. Smith, H.J. An evaluation of low temperature sterilization of trichinae infected park / H.J. Smith // Canadian Journal of Comparative Medicine. – 1975. – V. 39. – №. 3. – P. 316.

227. Smith, H.J. Differentiation of *Trichinella spiralis spiralis* and *Trichinella spiralis nativa* based on resistance to low temperature refrigeration / H.J. Smith // Canadian Journal of Comparative Medicine. – 1983. – V. 47. – №. 4. – P. 501.

228. Smythe, C. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis / C. Smythe, P. Cohen // EJB Reviews 1991. Springer Berlin Heidelberg. – 1991. – P. 149-155.

229. Solana, H.D. The anthelmintic albendazole affects in vivo the dynamics and the detyrosination-tyrosination cycle of rat brain microtubules / H.D. Solana, M.T. Teruel, R. Najle, C.E. Lanusse, J.A. Rodriguez // Acta physiologica, pharmacologica et therapeutica latinoamericana: organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y [de] la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia. – 1998. – V. 48. – №. 4. – P. 199-205.

230. Stapleton, D. Analysis of hepatic glycogen-associated proteins / D. Stapleton, C. Nelson, K. Parsawar, D. McClain, R. Gilbert-Wilson, E. Barker, G. Parker // Proteomics. – 2010. – V. 10. – №. 12. – P. 2320-2329.

231. Stewart, G.L. Studies in Biochemical Pathology in Trichinosis. II. Changes in Liver and Muscle Glycogen and Some Blood Chemical Parameters in Mice / G.L. Stewart // Rice Institute Pamphlet-Rice University Studies. – 1976. – V. 62. – №. 4. – P. 211-224.

232. Stiernagle, T. Maintenance of *C. elegans* / T. Stiernagle // *C. elegans: A Practical Approach*. – 1999. – V. 2. – P. 51-67.

233. Stone, D.B. Phosphofructokinase from the liver fluke *Fasciola hepatica*: I. Activation by adenosine 3', 5'-phosphate and by serotonin / D.B. Stone, T.A.G.E. Mansour // Molecular Pharmacology. – 1967. – V. 3. – №. 2. – P. 161-176.

234. Sullivan, M.A. Nature of α and β particles in glycogen using molecular size distributions / M.A. Sullivan, F. Vilaplana, R.A. Cave, D. Stapleton, A.A. Gray-Weale, R.G. Gilbert // *Biomacromolecules*. – 2010. – V. 11. – №. 4. – P. 1094-1100.

235. Tandon, V. Anthelmintic efficacy of *Flemingia vestita* (Fabaceae): effect of genistein on glycogen metabolism in the cestode, *Raillietina echinobothrida* / V. Tandon, B. Das, N. Saha // *Parasitology international*. – 2003. – V. 52. – №. 2. – P. 179-183.

236. Tao, Z. Effects of mebendazole and albendazole compounds on ascaris and hookworm and ultrastructural observations / Z. Tao, S. Yiping // *Journal of practical parasitic diseases*. – 1997. – V. 3. – P. 112-118.

237. Tayal, S. In vitro estimation of glycogen content in three sheep cestodes / S. Tayal, G. Premvati // *Folia parasitologica*. – 1982. – V. 29. – №. 3. – P. 259-263.

238. Thieltges, D.W. Effect of temperature on emergence, survival and infectivity of cercariae of the marine trematode *Renicola roscovita* (Digenea: Renicolidae) / D.W. Thieltges, J. Rick // *Diseases of aquatic organisms*. – 2006. – V. 73. – №. 1. – P. 63-68.

239. Threadgold, L.T. *Fasciola hepatica*: stereological analysis of vitelline cell development / L.T. Threadgold // *Experimental Parasitology*. – 1982. – V. 54. – №. 3. – P. 352-365.

240. Tielens, A.G.M. Aerobic and anaerobic energy metabolism in the life cycle of parasitic helminths / A.G.M. Tielens, S.G. Van den Bergh // *Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation*. CRC Press, Boca Raton, FL. – 1993. – P. 19-40.

241. Tielens, A.G.M. Carbohydrate metabolism in adult schistosomes of different strains and species / A.G.M. Tielens, B.E.P. Van Oordt, S.G. van Den Bergh // *International journal for parasitology*. – 1989. – V. 19. – №. 4. – P. 447-449.

242. Tielens, A.G.M. Changes in energy metabolism of the juvenile *Fasciola hepatica* during its development in the liver parenchyma / A.G.M. Tielens, J.M. Van Den Heuvel, S.G. Van Den Bergh // *Molecular and biochemical parasitology*. – 1982. – V. 6. – №. 5. – P. 277-286.

243. Tielens, A.G.M. Energy generation in parasitic helminths / A.G.M. Tielens // *Parasitology today*. – 1994. – V. 10. – №. 9. – P. 346-352.

244. Tielens, A.G.M. The aerobic energy metabolism of the juvenile *Fasciola hepatica* / A.G.M. Tielens, P. Van der Meer, S.G. Van den Bergh // *Molecular and Biochemical Parasitology*. – 1981. – V. 3. – №. 4. – P. 205-214.

245. Tielens, A.G.M. The energy metabolism of *Fasciola hepatica* during its development in the final host / A.G.M. Tielens, J.M. van den Heuvel, S.G. van den Bergh // *Molecular and biochemical parasitology*. – 1984. – V. 13. – №. 3. – P. 301-307.

246. Urrea-Paris, M.A. *Echinococcus granulosus*: praziquantel treatment against the metacestode stage / M.A. Urrea-Paris, M.J. Moreno, N. Casado, F. Rodriguez-Caabeiro // *Parasitology Research*. – 1999. – V. 85. – №. 12. – P. 999-1006.

247. Van den Bossche, H. Effects of mebendazole on the absorption of low molecular weight nutrients by *Ascaris suum* / H. Van den Bossche, S. De Nollin // *International journal for parasitology*. – 1973. – V. 3. – №. 3. – P. 401-407.

248. Van Oordt, B.E.P. The energy metabolism of *Schistosoma mansoni* during its development in the hamster / B.E.P. Van Oordt, A.G.M. Tielens, S.G. Van den Bergh // *Parasitology research*. – 1988. – V. 75. – №. 1. – P. 31-35.

249. Vinaud, M.C. *Taenia crassiceps*: energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole in vitro / M.C. Vinaud, C.S. Ferreira, R.D.S.L. Junior, J.C.B. Bezerra // *Experimental parasitology*. – 2008. – V. 120. – №. 3. – P. 221-226.

250. Vinayakam, A. Distribution of lyo- and desmo-glycogen in relation to growth and maturity of proglottids of *Moniezia benedeni* / A. Vinayakam // *Folia parasitologica*. – 1985. – V. 32. – №. 1. – P. 67-71.

251. Von Brand, T. *Biochemistry of parasites*. 2nd edition. / T. Von Brand. – London: Academic Press, 1973. – 499 p.

252. Von Brand, T. Histochemical glycogen studies on *Fasciola hepatica* / T. Von Brand, T.I. Mercado // *The Journal of parasitology*. – 1961. – V. 47. – №. 3. – P. 459-461.

253. Wastling, J.M. Cyclosporin A: drug treatment in vivo affects the kinetics of [14C] glucose transport in *Hymenolepis microstoma* in vitro / J.M. Wastling, L.H. Chappell // *Parasitology*. – 1994. – V. 108. – №. 2. – P. 223-228.

254. Whitfield, P.J. Experimental investigations on the behaviour of the cercariae of an ectoparasitic digenean *Transversotrema patialense*: general activity patterns / P.J. Whitfield, R.M. Anderson, D.A.P. Bundy // *Parasitology*. – 1977. – V. 75. – №. 1. – P. 9-30.

255. Williams, J.P.G. Intermediary metabolism in the immature liver fluke, *Fasciola hepatica* L / J.P.G. Williams, C. Bryant // *Nature*. – 1963. – V. 200. – №. 4905. – P. 489-489.

256. Wilson, R.A. A physiological study of the development of the egg of *Fasciola hepatica* L., the common liver fluke / R.A. Wilson // *Comparative biochemistry and physiology*. – 1967. – V. 21. – №. 2. – P. 307-320.

257. Wu, Z. Hypoglycaemia induced by *Trichinella* infection is due to the increase of glucose uptake in infected muscle cells / Z. Wu, I. Nagano, K. Kajita, M. Nishina, Y. Takahashi // *International journal for parasitology*. – 2009. – V. 39. – №. 4. – P. 427-434.

258. Xiao, S.H. Effect of mebendazole, albendazole and albendazole sulfoxide on glycogen contents of *Echinococcus granulosus* cysts in infected mice / S.H. Xiao, Y.Q. Yang, H.F. Guo, C.W. Zhang, P.Y. Jiao, J.Q. You, W. Jiao // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 1990. – V. 11. – №. 6. – P. 546-549.

259. Xiaoning, C. Research on mechanism of adz action on encysted larva of *Trichinella spiralis* in mice / C. Xiaoning // *Journal of chengde medical college*. – 1997. – P. 44-48.

260. Xu, D. Electron microscopic observations on the normal development of *Trichinella spiralis* from muscle larvae to adult worms in BALB/c mice with emphasis on the body wall, genital organs and gastrointestinal organs / D. Xu, I. Nagano, Y. Takahashi // *Microscopy*. – 1997. – V. 46. – №. 4. – P. 347-352.

261. Yang, X.R. Scanning tunneling microscopic images show a laminated structure for glycogen molecules / X.R. Yang, Q. Li, R. Yu, L. Kong // The FASEB Journal. – 1990. – V. 4. – №. 13. – P. 3140-3143.

262. Zhaojun, C. Observations on the effects of albendazole on the glycogen of cysticerci / C. Zhaojun // Chinese Journal of Zoonoses. – 1989. – V. 4. – P. 113-118.

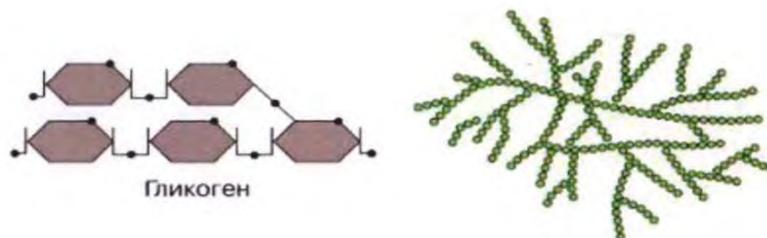
8. ПРИЛОЖЕНИЕ

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

ОЦЕНКИ ИНВАЗИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ЛИЧИНОК ГЕЛЬМИНТОЗООНОЗОВ ПО СОДЕРЖАНИЮ ГЛИКОГЕНА

Андреянов О.Н., Сидор Е.А., Постевой А.Н., Успенский А.В.



Москва 2019

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2681167

**Способ определения количества гликогена в личинках
трихинелл для контроля качества обезвреживания
инвазионного материала**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение "Федеральный научный центр -
Всероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и
Я.Р. Коваленко Российской академии наук" (RU)*

Авторы: *Андреянов Олег Николаевич (RU), Сидор Евгения
Александровна (RU), Тимофеева Ольга Геннадиевна (RU)*

Заявка № 2018106639

Приоритет изобретения 22 февраля 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 04 марта 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 22 февраля 2038 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев