

На правах рукописи



ФРОЛОВА
Татьяна Викторовна

**АКТИВНОСТЬ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ РЫБ ПРИ
ЗАРАЖЕНИИ ЦЕСТОДАМИ И ЗАЩИТА ПАРАЗИТА ОТ ПРОТЕИНАЗ
ХОЗЯИНА**

03.02.04 – зоология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

БОРОК – 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН»

**Научный
руководитель:**

Извекова Галина Игоревна,
доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологической паразитологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН»

**Официальные
оппоненты:**

Бисерова Наталья Михайловна,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры зоологии беспозвоночных Биологического факультета ФГБОУ ВО «Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова»

Скворцова Елена Гамеровна,
кандидат биологических наук, доцент, заведующая кафедрой зоотехнии ФГБОУ ВО «Ярославская государственная сельскохозяйственная академия»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского Отделения Российской академии наук, г. Улан-Удэ.

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в __ час. на заседании диссертационного совета Д 002.036.02 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН по адресу: 152742, Ярославская обл., Некоузский район, п. Борок. Тел./факс: (48547) 24042, e-mail: dissovet@ibiw.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН и на сайте ИБВВ РАН (<http://www.ibiw.ru>), с авторефератом – в сети Интернет на сайтах ВАК РФ (<https://vak.minobrnauki.gov.ru/main>) и ИБВВ РАН (<http://www.ibiw.ru>).

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета, доктор биологических наук



Л.Г. Корнева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одна из важнейших задач зоологии – изучение жизнедеятельности и поведения животных в разных условиях обитания. Внутриорганизменная среда – уникальная среда обитания для паразитических организмов. И всестороннее изучение взаимоотношений паразита и его хозяина представляется крайне важным. Известно, что паразит и хозяин взаимодействуют как две подвижные равновесные биологические системы, деятельность которых направлена на сохранение общего гомеостаза (Малютина, 2008). В результате взаимных адаптаций в ходе эволюции паразит приспосабливается к конкретной среде обитания в организме хозяина, а тот, в свою очередь, приобретает функциональные свойства, обеспечивающие защиту от воздействия паразитарного фактора (Беэр, 2004).

Паразиты способны оказывать влияние на различные процессы в организме хозяина, в том числе на функционирование пищеварительной системы (Куровская, 1993; Arnott et al., 2000; Извекова, Куклина, 2014). Наиболее активное взаимодействие с пищеварительной системой хозяина характерно для цестод, обитающих в кишечнике, в силу ярко выраженного морфологического сходства их тегумента со щеточной каймой слизистой оболочки кишечника хозяина (Куперман, 1988; Dalton et al., 2004). Прикрепляясь к стенке кишечника, черви повреждают эпителий, продуцируют и выделяют токсические вещества и при высокой интенсивности инвазии закупоривают просвет кишечника.

Кишечник позвоночных животных – идеальное окружение для населяющих его цестод, в то же время обитатели этой среды постоянно подвергаются потенциально деструктивному воздействию протеолитических ферментов. Один из главных механизмов защиты от протеиназ хозяина, наряду с выработкой муцина, – секреция ингибиторов (Шишова-Касаточкина, Павлов, 1969; Сопрунов, 1987; Pappas, Uglem, 1990). Ингибиторы протеиназ, также, как и сами протеиназы, играют важную роль в жизненном цикле паразитов, их вирулентности и патогенезе (Rascón, McKerrow, 2013). Ингибиторы продуцируются паразитами для предотвращения протеолиза протеиназами хозяина и выживания. Существует предположение, что от ингибиторов протеиназ паразитов зависит специфичность паразита к хозяину (Hawley, Peanasky, 1992).

Многочисленные исследования посвящены ингибиторам протеиназ у широкого круга нематод (обзор: Кнох, 2007). Аналогичных работ, касающихся цестод, немного, выполнены они достаточно давно и в основном посвящены *Hymenolepis diminuta* или *H. microstoma* (Pappas, Read, 1972 a; Pappas, 1978; Schroeder, Pappas, 1980; Schroeder et al., 1981; Pappas, 1987; Pappas, Uglem, 1990).

Данные, касающиеся ингибиторов протеиназ у цестод из рыб, единичны (Matskási, Juhász, 1977; Matskási, Németh, 1979). Имеются сведения о том, что неповрежденная цестода *Proteocephalus longicollis* из лососевых рыб секретирует в среду ингибитор трипсина (Reichenbach-Klinke, Reichenbach-Klinke, 1970: цит. по Pappas, Read, 1972 a). Установлено также, что экстракты, приготовленные из личинок и взрослых червей *Bothriocephalus acheilognathi*, угнетали трипсиновую и химотрипсиновую активность кишечника карпа *in vitro* (Matskási, 1984). Представляется важным накопление фактического материала по продуцированию ингибиторов протеиназ разными видами цестод на различных стадиях жизненного цикла из хозяев, различающихся по типу питания и уровню обмена веществ для

поиска общих закономерностей и отличительных особенностей взаимоотношений в системе паразит–хозяин на физиолого-биохимическом уровне.

Цель работы: определить влияние некоторых видов цестод на активность и спектр пищеварительных ферментов хозяев – рыб и способность цестод ингибировать активность протеиназ.

Задачи исследования:

1. Установить, как изменяется активность протеиназ и гликозидаз в кишечнике рыб, зараженных цестодами.

2. Провести ингибиторный анализ протеиназ с целью выявления изменений спектра этих ферментов под влиянием заражения.

3. Дать характеристику десорбции протеолитических ферментов с тегумента цестод на примере *T. nodulosus* из кишечника щуки.

4. Установить способность живых цестод ингибировать активность коммерческого препарата трипсина в опытах *in vitro* на примере цестоды *E. rugosum*.

5. Выявить способность среды инкубации и экстракта цестод инактивировать протеолитические ферменты хозяина и коммерческий препарат трипсина.

Научная новизна. Впервые представлены данные о влиянии цестод, обитающих в кишечнике на активность пищеварительных ферментов исследованных видов рыб, установлено влияние заражения на спектр протеиназ хозяев.

Впервые изучено влияние плероцеркоидов *T. nodulosus*, обитающих в печени, на активность пищеварительных гидролаз промежуточного хозяина – окуня старших возрастных групп.

Впервые в средах инкубации и экстрактах исследованных видов цестод установлено присутствие компонента, обладающего способностью ингибировать протеиназы хозяина и коммерческий препарат трипсина.

Впервые проведена оценка селективности ингибиторного воздействия экстракта червя и синтетического ингибитора PMSF на протеиназы хозяина и других видов рыб.

Положения, выносимые на защиту:

1. При заражении цестодами активность протеолитических ферментов в кишечнике исследованных видов рыб снижается, а гликозидаз существенно не изменяется.

2. Снижение протеолитической активности в кишечнике хозяина при гельминтной инвазии происходит главным образом за счет снижения доли сериновых и металлопротеиназ.

3. Живые цестоды, содержащиеся в растворе коммерческого препарата трипсина разных концентраций, не только не подвергаются протеолизу, но и ингибируют активность трипсина.

4. Исследованные виды цестод, обитающие в кишечнике рыб, секретируют вещества, ингибирующие активность коммерческого препарата трипсина и протеиназ хозяина.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенное исследование дополняет и расширяет имеющийся фактический материал о взаимоотношениях в системе паразит–хозяин на примере паразитирования низших цестод в кишечнике окончательного хозяина – рыб. Полученные в ходе работы результаты позволили установить степень влияния заражения на активность пищеварительных ферментов хозяев; определить изменение спектра протеолитических ферментов при заражении; выявить причины изменения этого

спектра; выяснить способность цестод продуцировать ингибиторы протеиназ; установить основные закономерности функционирования исследуемых систем. Накопление фактического материала и определение общих закономерностей и отличительных особенностей функционирования на физиолого-биохимическом уровне – важная задача при исследовании взаимоотношений в системе паразит–хозяин.

Материалы диссертации могут быть использованы в лекционных курсах для студентов ВУЗов по специальностям "Зоология", "Ихтиология" и "Паразитология".

Систематизированные представления по влиянию цестод на активность пищеварительных ферментов рыб могут найти применение при разработке мер борьбы с гельминтозами, в прудовых хозяйствах в том числе.

Работа выполнена в рамках государственного задания (№ госрегистрации АААА-А18-118012690100-5) и грантов РФФИ (проекты № 15-04-02474 и № 16-34-50011).

Методология и методы исследования. В данной работе использованы современные методы биохимических и физиологических исследований. Используются спектрофотометрические методы определения активности ферментов: модифицированный метод Нельсона (Уголев и др., 1969) (амилолитическая активность и активность сахаразы), метод определения суммарной активности протеиназ (Alarcón et al., 2002); ингибиторный анализ (определение спектра протеиназ); метод последовательной десорбции. Комплексный спектр используемых методов включает ряд теоретических расчётов и анализов *in vitro*.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов обеспечена достаточным количеством особей рыб и цестод, использованных для получения соответствующих биологических повторностей измерений, и адекватным использованием статистических методов обработки полученных данных.

Апробация результатов. Результаты работы представлены на V Межрегиональной конференции "Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке" (Новосибирск, 2015); на VI Всероссийской конференции с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии» (Севастополь, 2016); на XVI Всероссийской молодёжной гидробиологической конференции «Перспективы и проблемы современной гидробиологии» (Борок, 2016); на Международной научной конференции «Фауна и экология паразитов» (Москва, 2016); на VI Съезде Паразитологического общества: Международная конференция «Современная паразитология – основные тренды и вызовы» (Санкт–Петербург, 2018).

Публикации. Материалы диссертации отражены в 15 публикациях (8 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 6 из которых индексируются в системах Web of Science и Scopus).

Объём и структура диссертации.

Основной текст диссертации с иллюстрациями изложен на 120 страницах, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и списка литературы, содержит 7 таблиц и 24 рисунка. Список литературы включает 150 наименования, из них 94 публикации на иностранных языках.

Соответствие паспорту научной специальности. Результаты диссертационной работы соответствуют специальности 03.02.04 – зоология, конкретно пунктам 11 – "Зоология беспозвоночных", 12 – "Гельминтология" и 14 – «Ихтиология». Зоология – область биологической науки, изучающая многообразие и

систематику животного мира, строение, закономерности распространения, численности, индивидуального развития и эволюции. Зоология служит основой для разработки мер контроля за паразитическими животными, переносчиками возбудителей болезней. Некоторые разделы зоологии входят в комплексные науки: паразитологию, эпизоотологию, эпидемиологию, гидробиологию, экологию. В работе физиолого-биохимическими методами были решены вопросы, касающиеся одной из задач зоологии – изучение жизнедеятельности и поведения животных в разных условиях обитания. В частности, раскрыты некоторые аспекты взаимодействия в системе паразит–хозяин и адаптации паразита к условиям внутриорганизменной среды обитания.

Личный вклад соискателя. Автор принимал активное участие на всех этапах работы над диссертацией. Тема, цель, задачи, методы и программа исследований определены автором совместно с руководителем. Соискатель непосредственно или с помощью коллег участвовал в сборе материала для исследований. Автором лично были получены исходные данные, принято участие в их обработке и интерпретации, а также в подготовке материалов к публикации. Текст диссертации написан соискателем по плану, согласованному с научным руководителем.

Благодарности. Выражаю глубокую искреннюю признательность своему научному руководителю, д.б.н. Г. И. Извековой за чуткое руководство научной работой, за помощь на всех этапах ее выполнения и доброжелательную поддержку. Выражаю благодарность зав. лабораторией экологической паразитологии ИБВВ РАН д.б.н. А. Е. Жохову, предоставившему материал для исследований и оказавшему поддержку в ходе выполнения работы. Также выражаю благодарность к.б.н. Е. И. Извекову за большой вклад в обсуждение и подготовку результатов исследований к публикации. Выражаю признательность в.н.с. Института систематики и экологии животных СО РАН к.б.н. М. М. Соловьеву за участие в обсуждении результатов исследований. Считаю своим приятным долгом выразить глубокую признательность д.б.н. И. Л. Головановой за конструктивные замечания и постоянный интерес к моей научной работе. Кроме того, хочу поблагодарить н.с. Института биологии КарНЦ РАН к.б.н. А. Н. Паршукова за предоставленный материал для исследований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе дана краткая характеристика пищеварительных ферментов – протеиназ и гликозидаз. Приведена характеристика цестод и их взаимоотношений с окончательным хозяином, в том числе способность цестод к инактивации ферментов хозяина. Представлены сведения об ингибиторах протеиназ и их роли в жизнедеятельности паразитических червей на разных стадиях онтогенеза.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Объекты исследования. Работа проведена в 2015–2018 гг. в лаборатории экологической паразитологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН.

Объекты исследования – пресноводные рыбы, и паразитирующие в их организме черви класса Cestoda (табл. 1).

Сбор материала проводили весной 2015–2017 гг., в августе 2016–2017 гг., сентябре–ноябре 2015 г. и феврале 2016 г. в Рыбинском водохранилище (58°22'30" с.ш.; 38°28'04" в.д.); в феврале 2016 г. в реках Ильд и Чеснава (малые притоки Рыбинского водохранилища); сентябре 2015 г. в Ладожском озере (61°0'0" с.ш.; 31°30'0" в.д.). Орудиями лова служили: удочка, жаберные сети (размер ячеи 14–30 мм), донный трал. Сроки сбора материала связаны, в одних случаях, с сезонностью развития цестод в окончательном хозяине, в других – с возможностью отлова рыб. Всего было исследовано 114 рыб и несколько сотен паразитических червей.

Таблица 1. Объекты исследований

Хозяин	Систематическое положение хозяина	Паразит, стадия зрелости, локализация	Систематическое положение паразита
<i>Lota lota</i> (Linnaeus, 1758) – налим обыкновенный	отр. Gadiformes – Трескообразные, сем. Lotidae – Тресковые	<i>Eubothrium rugosum</i> Batsch, 1786 – взрослая особь, кишечник	отр. Bothriocephalidea, сем. Triaenophoridae
<i>Esox lucius</i> Linnaeus, 1758 – щука обыкновенная	отр. Esociformes – Щукообразные, сем. Esocidae – щуковые	<i>Triaenophorus nodulosus</i> Pallas, 1781 – взрослая особь, кишечник	отр. Bothriocephalidea, сем. Triaenophoridae
<i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus, 1758 – окунь речной	отр. Perciformes – Окунеобразные, сем. Percidae	<i>Triaenophorus nodulosus</i> – плероцеркоид, печень	отр. Bothriocephalidea, сем. Triaenophoridae
<i>Gymnocephalus cernuus</i> (Linnaeus, 1758) – ерш обыкновенный	отр. Perciformes – Окунеобразные, сем. Percidae	<i>Proteocephalus certuae</i> Gmelin, 1790 – взрослая особь, кишечник	отр. Onchoproteocephalidea, сем. Proteocephalidae
<i>Ballerus ballerus</i> (Linnaeus, 1758) – синец обыкновенный	отр. Cypriniformes – Карпообразные, сем. Cyprinidae – Карповые	<i>Proteocephalus torulosus</i> Batsch, 1786 – взрослая особь, кишечник	отр. Onchoproteocephalidea, сем. Proteocephalidae

Приготовление препаратов для исследований. После вылова рыб транспортировали в лабораторию в емкостях с водой или проводили сбор материала для дальнейших биохимических исследований на месте вылова. Вскрытие рыб, их кишечников, извлечение червей и приготовление различных препаратов производили на ледяной бане.

Кишечники рыб препарировали – делали продольный разрез, извлекали червей, удаляли хитин и скребком снимали слизистую оболочку. Извлеченных из кишечника хозяина цестод 3 раза тщательно промывали в 10 мл раствора Рингера с

целью удаления ферментов хозяина, адсорбированных на их поверхности. Целых цестод и слизистую оболочку кишечника рыб гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора фирмы Sartorius AG (Göttingen, Germany) и гомогенат разводили раствором Рингера для холоднокровных животных, рН 7.5 (6 г NaCl; 0.14 г KCl; 0.5 мл 10% CaCl₂; 0.54 г Na₂HPO₄; 0.02 г KН₂PO₄; 0.16 г MgSO₄ в 1 л дистиллированной воды) в массово-объемном соотношении 1:49 и 1:9 соответственно. Полученные гомогенаты центрифугировали при 9000 об/мин в течение 5 мин при 4°C. Для дальнейших исследований отбирали полученные супернатанты, которые замораживали и хранили при -20°C до дальнейшего использования.

В серии опытов по исследованию ингибирующей способности цестод использовали экстракты *T. nodulosus*, *E. rugosum* и *P. torulosus* или среды инкубации, полученные после содержания отмытых червей в течение 24 ч в растворе Рингера при температуре 10°C. В течение всего времени инкубации черви оставались живыми. После этого в среде измеряли значения рН, червей гомогенизировали и готовили экстракт, как описано выше.

Для рыб использовали индивидуальные гомогенаты, для цестод – индивидуальные гомогенаты или суммарные гомогенаты от нескольких особей и считали их за одну биологическую повторность (n), в зависимости от вида и размера.

Метод десорбции ферментов при исследовании адсорбционной способности цестод. Для определения адсорбционной способности цестод использовали модельную пару "щука – *T. nodulosus*". Кишечники рыб вскрывали, извлекали червей, делили их на группы по массе 0.4–0.7 г и помещали в 10 мл раствора Рингера (рН 7.5) для холоднокровных животных. С целью выяснения прочности ассоциации ферментов хозяина на пищеварительно-транспортной поверхности паразита червей первый раз встряхивали в растворе Рингера в течение 30 с, затем дважды переносили в свежий раствор и встряхивали в течение 15 мин. В результате были получены три фракции смывов с тегумента – Д1, Д2 и Д3, в которых затем определяли протеолитическую активность и спектр протеиназ методами, описанными ниже.

Методы исследования ферментативной активности и спектра протеиназ.

Амилолитическую активность, отражающую суммарную активность ферментов, гидролизующих крахмал (α -амилазы КФ 3.2.1.1, глюкоамилазы КФ 3.2.1.3 и мальтазы КФ 3.2.1.20) и активность сахаразы (КФ 3.2.1.48) определяли модифицированным методом Нельсона (Уголев и др., 1969) по приросту гексоз. В качестве субстратов использовали 1.8%-ный раствор растворимого крахмала и 100 мМ раствор сахарозы соответственно, приготовленные на растворе Рингера, рН 7.5. Интенсивность развивающегося окрашивания, пропорционального активности ферментов, измеряли на спектрофотометре Lambda 25 (PerkinElmer) при 560 нм. Активность ферментов (ЕА) выражали в микромолях глюкозы, образующейся за 1 мин инкубации ферментативно активного препарата и субстрата в расчете на 1 г влажной массы ткани (мкмоль/(г×мин)).

Суммарную активность протеиназ (активность трипсина КФ 3.4.21.4, химотрипсина КФ 3.4.21.1 и дипептидаз КФ 3.4.13.18) и протеолитическую активность коммерческого препарата трипсина определяли с использованием в качестве субстрата 0.3%-ного раствора азо-казеина в трис-буфере, рН 7.5 (Alarcón et al., 2002). Интенсивность развивающегося окрашивания, пропорционального

активности ферментов, измеряли в супернатанте при 440 нм на спектрофотометре Lambda 25 (PerkinElmer).

Идентификацию различных подклассов (спектр) протеиназ в смывах с тегумента червей и гомогенатах слизистой оболочки кишечника рыб проводили с помощью ингибиторного анализа с использованием следующих коммерческих ингибиторов: 1) PMSF (фенил-метил-сульфонил-флуорид) – ингибитор сериновых протеиназ в концентрации 100 мМ в DMSO (диметилсульфоксид); 2) EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) – ингибитор металлопротеаз в концентрации 0.5 М в 1 М NaOH и 3) E-64 – ингибитор цистеиновых (тиоловых) протеиназ в концентрации 1 мМ в дистиллированной воде. В опытную среду, содержащую гомогенат слизистой оболочки кишечника рыб или фракции смывов с тегумента цестод, добавляли коммерческий ингибитор и инкубировали в течение 15 мин при 20–22°C. Одновременно в соответствующую контрольную пробу добавляли аналогичный объем трис-буфера. После инкубации в пробах определяли протеолитическую активность.

Единицы протеиназной активности (ЕА) вычисляли по формуле:

$$EA = \Delta E_{440} / mT,$$

где ΔE_{440} – разница показаний спектрофотометра пробы с субстратом и холостой пробы (при длине волны 440 нм); m – масса слизистой оболочки кишечника, фракции смыва с тегумента или раствора трипсина (г); T – время инкубации, мин ($\Delta E_{440} / (г \times \text{мин})$). В холостую пробу вместо ферментативно активного препарата добавляли соответствующий объем раствора Рингера.

Исследование ингибирующей способности цестод. В опытах по ингибированию трипсина живыми червями использовали коммерческий препарат свиного трипсина (MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA; activity 250 USP) концентрацией 0.005 мг/мл и 0.01 мг/мл. Через 1, 2 и 24 часа содержания червей в трипсине при 10°C определяли его активность по методике, описанной выше, и сравнивали с активностью контрольного образца раствора трипсина, хранящегося в аналогичных условиях.

При определении ингибирующей способности червей источником протеиназ служили гомогенат слизистой оболочки кишечника хозяина и раствор коммерческого препарата трипсина в концентрациях 0.0025, 0.005, 0.0075, 0.01 и 1 мг/мл в трис-буфере (рН 7.5). Для определения ингибирующей способности в опытную среду, содержащую гомогенат слизистой оболочки или раствор трипсина определенной концентрации, добавляли среду инкубации червей или их экстракт и инкубировали в течение 15 мин при 20–22°C. Одновременно в соответствующую контрольную пробу добавляли аналогичный объем трис-буфера. После этой инкубации в пробах определяли протеолитическую активность как описано выше.

Количественная оценка видовой селективности ингибиторов.

Селективность ингибирующего воздействия экстракта *E. rugosum* и PMSF на протеиназы хозяина и других видов рыб оценивали с помощью индекса Джини (Graczyk, 2007). Этот показатель рассчитывается для набора значений процентного ингибирования, полученных при одной и той же концентрации ингибитора. Значения сортировали в порядке усиления ингибирующего эффекта, суммировали и нормализовали. Затем вычисляли индекс Джини, анализируя зависимость кумулятивной доли суммарного ингибирования от кумулятивной доли числа тестируемых видов. Показатель может принимать значения от нуля (отсутствие селективности) до единицы (абсолютная селективность). Расчеты проводили в двух

вариантах: 1) для всего набора из семи исследуемых видов рыб (форель, окунь, налим, судак, синец, лещ, щука) и 2) для более узкого круга из пяти хищных видов (т.е. за исключением леща и синца).

Статистическая обработка данных. Результаты представлены в виде средних и их стандартных ошибок. Обработка результатов выполнена с помощью статистических пакетов “Microsoft Excel 2010” и STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Ингибирующие эффекты для *T. nodulosus* и *E. rugosum* были проанализированы с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением критерия Даннета для сравнения множественных значений с одним контрольным или критерия Тьюки для множественного сравнения средних значений. Уровень значимости различий был установлен $p < 0.05$.

Достоверность различий в эффективности ингибирования между экстрактом гельминта и синтетическим ингибитором PMSF в процентном выражении оценивали с помощью двухстороннего критерия Манна–Уитни для каждого вида рыб в отдельности. С помощью этого же критерия определяли достоверность различий и в работах с синцом, окунем и ершом.

В каждой серии опытов n равно количеству исследованных рыб каждого вида или групп червей. Все биохимические определения проводили в трех повторностях.

Глава 3. Активность пищеварительных ферментов хозяина при заражении цестодами

Синец – *Proteocephalus torulosus*. В ходе исследования установлено влияние инвазии цестоды *P. torulosus* на активность пищеварительных ферментов синца. Активность амилаз у заражённых рыб была несколько выше аналогичных значений у незараженных рыб ($p < 0.1$), однако уровень активности сахаразы практически не зависел от заражения цестодами. В то же время в гомогенате слизистой оболочки кишечника рыб, зараженных *P. torulosus*, наблюдалось небольшое снижение как общей протеолитической активности, так и активности отдельных подклассов протеиназ по сравнению с незараженными особями ($p < 0.01$; рис.1). В гомогенате слизистой оболочки кишечника зараженных рыб общая протеолитическая активность снижалась на 39%.

На основе полученных данных о влиянии ингибиторов на активность протеиназ вычислены доли различных подклассов протеиназ, функционирующих в кишечниках незараженных и зараженных синцов. Отмечено влияние заражения цестодами на спектр протеиназ в кишечнике хозяина. Основную долю составляют сериновые протеиназы (59% и 49% у незараженных и зараженных рыб соответственно). У зараженных рыб наблюдалось снижение относительного содержания сериновых протеиназ и металлопротеиназ, при этом следует отметить, что ингибиторный анализ не выявил наличия в кишечниках зараженных особей металлопротеиназ, а доля цистеиновых протеиназ незначительно увеличивалась у рыб, инвазированных *P. torulosus*.

Нами установлено, что протеиназы синца и окуня более чувствительны к заражению цестодами, чем гликозидазы. Это согласуется с ранее полученными сведениями о влиянии заражения цестодами на активность пищеварительных ферментов в кишечнике леща и налима (Извекова, Соловьев, 2012). Кроме того,

показано, что протеиназы кишечника некоторых видов рыб более чувствительны к действию органических загрязняющих веществ (Golovanova et al., 2011) и тяжелых металлов (Filiprov, Golovanova, 2010; Кузьмина и др., 2005) по сравнению с гликозидазами.

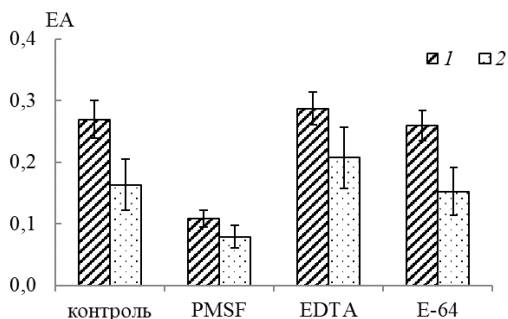


Рис. 1. Влияние заражения цестодами *P. torulosus* на протеолитическую активность и спектр протеиназ слизистой оболочки кишечника синца.

PMSF – сериновые протеиназы, EDTA – металлопротеиназы, E-64 – цистеиновые протеиназы.

1 – незараженные особи (n=7), 2 – зараженные особи (n=6)

Ерш – *Proteocephalus cernuae*. Исследованные рыбы были разделены на 3 группы, одинаковые по длине тела: I – 9.58 ± 0.24 , II – 9.65 ± 0.34 , III – 9.87 ± 0.14 см. Длина кишечника ершей составляла 5.9 ± 0.74 см (4.7 – 7.3 см). В группу I вошли ерши, не заражённые цестодой *P. cernuae* (n=10). В группе II суммарная длина цестод составляла 4.15 ± 0.3 см (n=6), а в группе III – 11.11 ± 1.58 см (n=7), т.е. по этому показателю группы ершей достоверно различались ($p < 0.05$). Коэффициент Д_ч/Д_к (соотношение суммарной длины червей к длине кишечника) для рыб группы II также был значительно ниже, чем для рыб группы III (0.71 ± 0.05 и 1.84 ± 0.25 соответственно; $p < 0.05$).

В результате проведенных экспериментов установлено, что заражение ерша цестодой *P. cernuae* влияет на активность протеиназ кишечника хозяина (Рис.2). Изменение активности различается для групп рыб II и III, т.е. зависит от коэффициента Д_ч/Д_к. Так, активность протеиназ у ершей группы II снижается ($p < 0.05$), группы III – повышается ($p < 0.05$) по сравнению с аналогичным показателем у незараженных рыб группы I. В то же время различия активности протеиназ у ершей группы II и III более значимы ($p < 0.05$).

На основе полученных данных о влиянии ингибиторов на активность протеиназ вычислены доли различных подклассов протеиназ, функционирующих в кишечниках незараженных и зараженных ершей. Основную долю (от 46 до 71% в зависимости от зараженности) составляют сериновые протеиназы. При этом доля сериновых протеиназ у ершей группы II ниже, чем у рыб группы I ($p = 0.05$) и III ($p < 0.05$). Доли металлопротеиназ у рыб трех исследованных групп значимо не различались и составляли 24–36% общей активности протеиназ. Доля цистеиновых протеиназ составила от 6 до 14% в зависимости от группы ершей и была выше у рыб группы I по сравнению с показателями рыб группы II ($p < 0.1$).

Правомерность разделения исследованных рыб на группы подтверждается, с одной стороны, отсутствием различий в размерах рыб между группами, с другой – достоверными различиями суммарной длины червей и коэффициента D_{Σ}/D_k в группах рыб II и III. Кроме того, деление ершей на группы в зависимости от суммарной длины червей в кишечнике позволило получить значимые различия в значениях активности протеиназ.

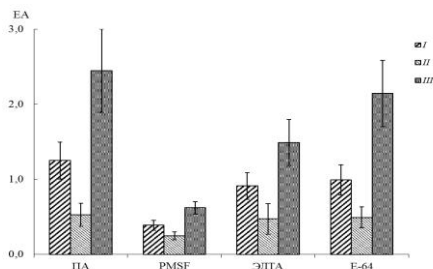


Рис. 2. Протеолитическая активность в кишечнике ерша в зависимости от зараженности рыб цестодой *P. certuae* и влияние на нее различных ингибиторов, $\Delta E_{440}/(г \times мин)$. ПА – общая протеолитическая активность, PMSF – ингибитор сериновых протеиназ, EDTA – ингибитор металлопротеиназ, E-64 – ингибитор цистеиновых (тиоловых) протеиназ.

I, II, III – группы рыб (пояснения в тексте).

Снижение активности протеиназ у ершей группы II по сравнению с незараженными рыбами группы I согласуется с представлениями о влиянии строения прикрепительных образований цестод на активность протеиназ хозяев. Снижение протеолитической активности в этом случае может быть связано с адсорбцией ферментов хозяина на поверхности цестод и их ингибированием (Извекова, Соловьев, 2016). Однако у ершей группы III активность протеиназ выше, чем у рыб групп I и II. В отличие от других исследованных ранее животных, для которых показано влияние строения прикрепительных аппаратов цестод на активность протеиназ хозяев (Извекова, Куклина, 2014), ерш – мелкая рыба с очень тонким кишечником. При паразитировании червей с большой суммарной длиной коэффициент D_{Σ}/D_k у ерша в 2.6 раза выше, чем у рыб с малой суммарной длиной паразитов. Возможно, в этом случае в ответ на высокую паразитарную нагрузку включаются адаптационные механизмы хозяина и повышается активность его пищеварительных ферментов. Это согласуется с предположением о том, что зараженные хозяева компенсируют негативное воздействие кишечных паразитов увеличением пищевой активности (Bosi et al., 2005).

Окунь – плероцеркоиды *Triaenophorus nodulosus*. Проведенные исследования показали, что активность протеиназ у незараженных рыб ($n=9$) достоверно выше, чем у зараженных ($n=5$) ($p<0.05$). Кроме того, в зависимости от заражения по-разному сказывалось влияние ингибиторов на активность протеиназ.

На основе полученных данных о влиянии ингибиторов на активность протеиназ вычислены доли различных подклассов протеиназ, функционирующих в кишечниках незараженных и зараженных окуней (Рис. 7). У зараженных рыб доля сериновых протеиназ снижается с 70 до 58%, металлопротеиназ – с 27 до 5%. В то же

время доля неидентифицированных протеиназ у зараженных рыб увеличивается с 1 до 36%.

Установлено, что заражение плероцеркоидами *T. nodulosus* существенно не влияло на активность гликозидаз в кишечнике окуня – отмечено незначительное снижение активности амилаз, активность сахаразы оставалась без изменений.

Вычислены соотношения активности ферментов у исследованных групп рыб: А/П – отношение активности амилаз к активности протеиназ, С/П – активности сахаразы к активности протеиназ, А/С – активности амилаз к активности сахаразы (Таблица 2). У зараженных плероцеркоидами рыб все соотношения выше, чем у незараженных, однако А/С выше незначительно, в 1.1 раза, в то время как А/П и С/П – выше в 5.5 и 5.2 раза соответственно, что свидетельствует об изменении соотношения активности ферментов этих групп при заражении.

Таблица 2. Соотношение активности ферментов у незараженных и зараженных *T. nodulosus* окуней

Группа рыб	А/П	С/П	А/С
Незараженные	0.20	0.01	16.43
Зараженные	1.11	0.06	17.53
К _з /К _н	5.5	5.2	1.1

Примечание. А/П – отношение активности амилаз к активности протеиназ, С/П – активности сахаразы к активности протеиназ, А/С – активности амилаз к активности сахаразы, К_з/К_н – отношение коэффициентов активности ферментов у зараженных и незараженных особей.

По нашему мнению, значительное повышение коэффициентов А/П и С/П связано с возрастными изменениями в питании окуней. В Ладожском озере окунь становится хищником в возрасте 7+, а младшие возрастные генерации имеют смешанное питание (Дятлов, 2002).

Адсорбция ферментов хозяина на пищеварительно-транспортной поверхности цестод (на примере *T. nodulosus*). На примере червей *T. nodulosus* исследована способность цестод адсорбировать на поверхности протеолитические ферменты хозяина. В результате проведенных исследований установлено, что протеолитические ферменты с поверхности червя *T. nodulosus* (n=6) смываются в основном во фракцию Д1, в которой активность ферментов достигала 0.49±0.03 ЕА. Во фракциях Д2 и Д3 фиксируется незначительная протеолитическая активность (0.003±0.001 и 0.002±0.001 ЕА соответственно). Показано, что PMSF существенно снижает активность протеиназ, смытых с тегумента цестод. Во фракции Д1 PMSF ингибирует 68.9±5.0% активности. С другой стороны, не установлено достоверного влияния EDTA и E-64 на активность десорбированных протеиназ. Во фракции Д3 не выявлено достоверного влияния на активность протеиназ ни одного из исследованных ингибиторов.

Ингибиторный анализ показал, что основную часть адсорбированных на тегументе ферментов составляют сериновые протеиназы. Очевидно, низкая активность протеиназ во фракциях Д2 и Д3 не позволила выявить достоверного влияния на нее ни одного из исследованных ингибиторов.

Заключение по главе. Таким образом, проведенные исследования адсорбционной способности цестод показали, что основная протеолитическая активность в смывах с тегумента цестоды *T. nodulosus* представлена в легко десорбируемой фракции, характеризующей активность ферментов хозяина. Активность этой фракции обусловлена большей частью сериновыми протеиназами.

Кроме того, установлено изменение активности пищеварительных ферментов хозяина при цестодной инвазии. Так, при заражении цестодой *P. torulosus* снижается активность протеолитических ферментов и изменяется спектр протеиназ в кишечнике синца. Заражение окуней старших возрастных групп плероцеркоидами *T. nodulosus* также приводит к снижению активности ферментов, обеспечивающих начальные этапы ассимиляции белковых компонентов пищи рыб, но не влияет на активность гликозидаз, что в свою очередь ведет к изменению соотношения активности этих ферментов и, очевидно, снижает эффективность питания рыб. Снижение протеолитической активности у зараженных рыб происходит вследствие уменьшения доли сериновых и металлопротеиназ. Эти изменения могут быть связаны с адсорбцией ферментов на пищеварительно-транспортной поверхности цестод и их ингибированием. Также отмечено повышение активности амилаз, что можно объяснить защитной реакцией организма хозяина на присутствие паразита.

В результате проведенных исследований по влиянию заражения ерша цестодами *P. cernuae* на активности протеолитических ферментов его кишечника показано, что эффект зависит от размеров населяющих кишечник цестод. Активность протеиназ убывает при малой суммарной длине паразитов и возрастает при их большой длине. Изменения затрагивают в основном сериновые протеиназы. Существенная доля активности представлена металлопротеиназами, что косвенно может свидетельствовать о большой роли микробиоты в пищеварении ерша. Небольшая доля цистеиновых протеиназ как у зараженных, так и незараженных цестодами рыб, возможно, указывает на незначительные повреждения кишечника прикрепительными аппаратами цестод.

Глава 4. Инактивация протеолитических ферментов рыб цестодами

Инактивация трипсина живыми червями *E. rugosum*. В ходе исследования установлено, что содержание червей (n=16) в растворе трипсина приводит к снижению его активности. При инкубации червей в растворе трипсина с концентрацией 0.005 мг/мл ингибирующее действие червей обнаруживается только после 24 ч. При использовании трипсина в концентрации 0.01 мг/мл ингибирование активности фермента наблюдается уже через 1 ч, к 24 ч инкубации отмечено небольшое увеличение эффекта ингибирования. Через 24 ч инкубации ингибирование трипсина обеих концентраций достигает примерно 60%.

Установленное ингибирующее действие живых червей на активность трипсина, возможно, связано с адсорбцией некоторого количества фермента на поверхности их тегумента. Концентрация трипсина 0.005 мг/мл очевидно слишком низкая, чтобы эффект проявился уже после 1 ч инкубации. По всей вероятности, к 24 ч на тегументе адсорбируется достаточное количество фермента, понижающее его количество и, соответственно, активность в окружающем растворе. Это также подтверждается увеличением доли ингибирования к 24 ч с 40 до 60% при инкубации червей в растворе трипсина в концентрации 0.01 мг/мл. Поскольку черви в растворе трипсина остаются живыми, а его инактивация не достигает 100%, можно допустить,

что даже неполная инактивация основного протеолитического фермента кишечника – трипсина – обеспечивает резистентность гельминтов в их среде обитания.

Ингибирующая способность среды инкубации и экстракта цестод. Для обнаружения ингибирующей способности цестод *E. rugosum*, *T. nodulosus* и *P. torulosus* по отношению к протеиназам использовали среды инкубации и экстракты червей, а также гомогенаты слизистой оболочки кишечника хозяина и раствор трипсина в различных концентрациях.

В связи с тем, что природная локальная гемипопуляция *E. rugosum* в хозяине – налеме неоднородна была проведена серия опытов, в которых червей распределили по двум группам – "короткие" (n=8) и "длинные" (n=5) (Таблица 3).

Таблица 3. Масса червей и содержание белка у *E. rugosum*

<i>E. rugosum</i>	Масса, г		Содержание белка	
	исследованной группы червей	одного червя	среда инкубации, мг/мл	гомогенат, мг/г
"Короткие"	0.89±0.24	0.14±0.03	0.76±0.10	17.28±0.54
"Длинные"	1.28±0.31	1.03±0.29	0.69±0.17	15.04±1.18

В результате исследований не обнаружено значительного ингибирующего эффекта на активность трипсина среды инкубации как "коротких", так и "длинных" червей *E. rugosum*. Отсутствие заметного ингибирующего эффекта активности трипсина средой инкубации червей подтверждает высказанное выше предположение об адсорбции части фермента на тегументе червей и, по крайней мере, его частичной инактивации. Либо количество выделяемого ингибитора слишком мало, что не позволило обнаружить его этим способом.

Обнаружено, что различные объемы, как среды инкубации (n=7), так и экстракта (n=8) *T. nodulosus* достоверно снижают протеолитическую активность трипсина в концентрации 0.01 мг/мл (Рис. 3). Уровень влияния ингибиторов, продуцируемых червем, сравним с действием синтетического ингибитора сериновых протеиназ – PMSF. Кроме того, установленные эффекты не зависели от объема исследуемого препарата (Рис. 3).

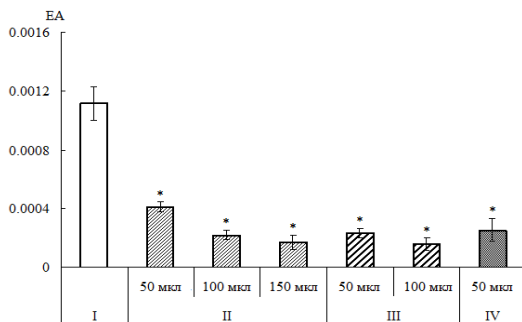


Рис. 3. Влияние различных источников ингибиторов на активность трипсина в концентрации 0.01 мг/мл (*достоверный ингибиторный эффект, $p < 0.05$).

I – контроль; II – среда инкубации *T. nodulosus*; III – экстракт *T. nodulosus*; IV – PMSF.

В серии опытов по влиянию экстрактов цестод на протеолитическую активность трипсина разных концентраций отмечена высокая доля ингибирования при концентрациях трипсина от 0.005 до 0.01 мг/мл (от 62 до 86 %). Проверка активности трипсина в зависимости от его концентрации показала, что она увеличивается с увеличением его концентрации ($p < 0.001$) (Рис. 4). При действии 50 мкл экстракта *E. rugosum* активность всех исследованных концентраций трипсина достоверно снижается. При этом уровень активности трипсина практически перестает быть зависимым от его концентрации (Рис. 4). Влияние экстракта червей разного размера на активность трипсина не различается ($p > 0.05$).

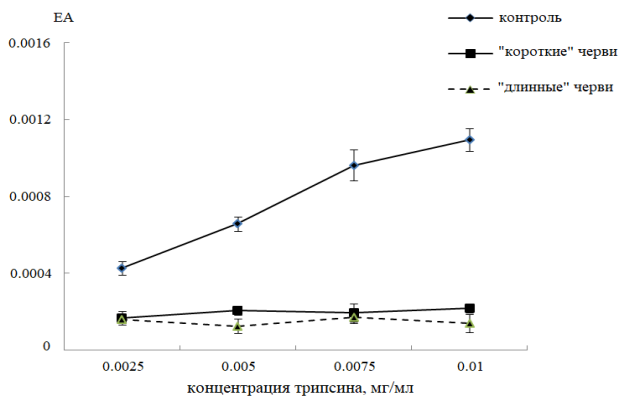


Рис. 4. Влияние 50 мкл экстракта *E. rugosum* на активность трипсина различной концентрации.

Контроль – активность раствора трипсина различных концентраций;

"короткие" черви и "длинные" черви – активность раствора трипсина различных концентраций при добавлении экстракта "коротких" и "длинных" червей.

В опытах с *T. nodulosus* при концентрации трипсина 0.0025 мг/мл его активность снижалась недостоверно, а при концентрации трипсина 1 мг/мл ингибирования активности фермента экстрактом червей не обнаружено (Рис. 5). Отсутствие достоверного влияния экстракта цестод на активность трипсина при слишком низкой (0.0025 мг/мл) и достаточно высокой (1 мг/мл) его концентрации может быть связано с недостаточной чувствительностью использованного метода в первом случае и «маскировке» эффекта ингибирования при его высокой концентрации и, соответственно, высокой активности, во втором.

Обнаружение более высокого ингибирующего эффекта у экстракта цестод, по сравнению со средой инкубации, свидетельствует в пользу предположения о том, что инактивация фермента происходит после его адсорбции. Трипсин различных концентраций ингибируется экстрактом не полностью, но в достаточно высокой мере, что защищает паразита от протеолиза.

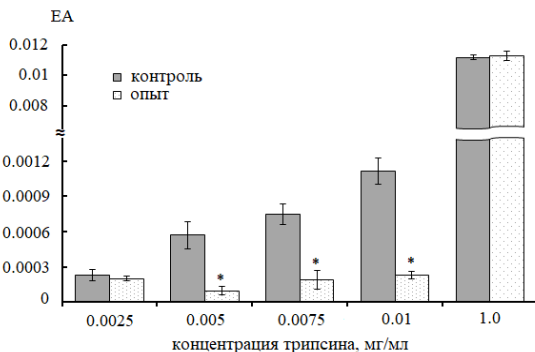


Рис. 5. Влияние 50 мкл экстракта *T. nodulosus* на активность трипсина разных концентраций (*достоверный ингибиторный эффект, $p < 0.05$).

Контроль – активность раствора трипсина в разных концентрациях;

опыт – активность трипсина в разных концентрациях при добавлении 50 мкл экстракта червя.

При исследовании влияния экстракта червей *E. rugosum* на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника хозяина-налима установлено, что 50 мкл экстракта как "коротких", так и "длинных" червей ингибируют протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника налима (Рис. 6). Эта активность также ингибируется PMSF. Полученные эффекты достоверны ($p < 0.05$). Кроме того, было установлено, что протеолитическая активность гомогената слизистой оболочки кишечника ингибируется PMSF в большей степени, чем экстрактом цестод ($p = 0.045$ для "коротких" червей и $p = 0.027$ – для "длинных"). PMSF ингибирует $64.3 \pm 3.8\%$ протеолитической активности слизистой оболочки, в то время как экстракт цестод – 45.4 ± 5.9 и $51.0 \pm 3.9\%$ этой активности для "коротких" и "длинных" червей соответственно.

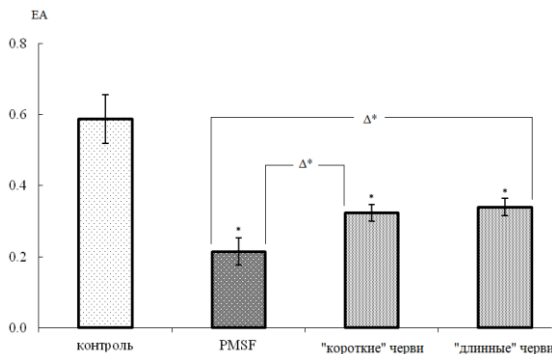


Рис. 6. Влияние 50 мкл экстракта червей *E. rugosum* на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника налима (*достоверный ингибиторный эффект; Δ^* достоверные различия между ингибиторной активностью экстрактов червей и PMSF, $p < 0.05$).

Полученные данные об ингибирующем действии экстракта цестод на активность протеиназ хозяев согласуются с имеющимися в литературе сведениями (Matskási, Juhász, 1977; Matskási, 1984). При этом известно, что большинство охарактеризованных белковых ингибиторов гельминтов относятся к группе ингибиторов сериновых протеиназ (Molehin et al., 2012).

В ходе исследования способности червя *P. torulosus* инактивировать протеолитические ферменты слизистой оболочки кишечника синца и коммерческий препарат трипсина выявлено, что экстракт червя ($n=3$) достоверно ($p<0.05$) снижает активность протеиназ в гомогенате слизистой оболочки кишечника хозяина – синца и активность коммерческого препарата трипсина в концентрации 0.01 мг/мл (Рис. 7).

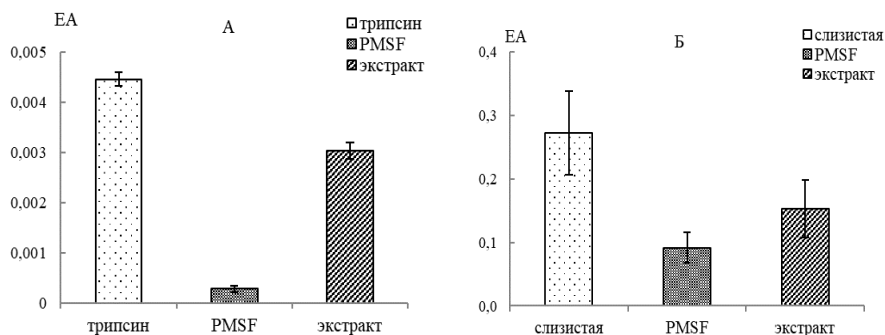


Рис. 7. Влияние PMSF и экстракта *P. torulosus* на активность коммерческого препарата трипсина в концентрации 0.01 мг/мл (А) и активность протеиназ слизистой оболочки кишечника синца (Б).

Экстракты *T. nodulosus* и *E. rugosum* показали большой ингибирующий эффект по отношению к коммерческому препарату трипсина, чем к протеиназам хозяина. Доля ингибирования трипсина в зависимости от его концентрации, а также объема и используемого источника ингибитора колеблется от 23% до 98%. Протеолитическая активность гомогената слизистой кишечника хозяина ингибируется на 14–51%. По-видимому, продуцируемый этими цестодами ингибитор специфичен для трипсина. В то же время экстракт *P. torulosus* в большей степени ингибировал активность протеиназ слизистой оболочки кишечника хозяина. Доли ингибирования протеолитической активности трипсина и слизистой оболочки составляют 32% и 51% соответственно. Это может быть связано как с более высоким сродством ингибитора червя с ферментами кишечника хозяина, так и с продуцированием цестодой смеси ингибиторов. При этом известно, что протеолитическая активность слизистой оболочки кишечника определяется не только активностью трипсина, но и химотрипсина и различных дипептидаз (Кузьмина, 1994).

Полученные данные показали, что исследованные цестоды продуцируют вещества, подавляющие активность как протеиназ, присутствующих в гомогенате слизистой оболочки кишечника хозяина, так и активность растворов коммерческого препарата трипсина различной концентрации. Сравнимые уровни снижения активности трипсина синтетическим ингибитором PMSF и ингибиторами, продуцируемыми червем, свидетельствуют о том, что ингибиторы цестоды

инактивируют сериновые протеиназы. Это согласуется с данными других авторов, показавших продукцию цестодами ингибиторов сериновых протеиназ (Pappas, 1978; Pappas, Uglem, 1990).

Рабочей гипотезой при разделении червей *E. rugosum* на группы "короткие" и "длинные" было предположение, что ингибирующая способность гельминтов может зависеть от степени зрелости червей (чем длиннее червь, тем он старше). Однако это предположение не нашло подтверждения в наших экспериментах. Во всех вариантах опытов ингибиторный эффект цестод *E. rugosum* не зависел от размера червей. Поскольку масса групп "коротких" не отличалась от массы групп "длинных" червей, можно предположить, что ингибиторный эффект скорее зависит от массы червей, чем от степени их зрелости. В наших экспериментах от размера червей не зависело и содержание белка в среде инкубации и экстракте. При этом известно, что ингибиторы протеиназ имеют белковую природу (Rawlings et al., 2004; Knox, 2007). Присутствие белка в среде инкубации объясняется также естественной сменой гликокаликса (Oaks, Lumsden, 1971).

Влияние экстракта *E. rugosum* на протеолитическую активность в гомогенате слизистой оболочки кишечника различных видов рыб. В результате проведенных исследований установлено, что добавление 50 мкл экстракта червя *E. rugosum* ($n=5$) к реакционной смеси при определении протеолитической активности слизистой оболочки кишечника налима снижает эту активность почти в 2 раза с 0.587 ± 0.068 до 0.323 ± 0.023 ЕА. PMSF снижает активность протеиназ слизистой оболочки кишечника налима до 0.214 ± 0.038 ЕА, что достоверно не отличается от значений, полученных при использовании экстракта червей как источника ингибитора. Однако при вычислении доли ингибирования экстрактом червей и PMSF обнаружены достоверные различия в этих показателях: экстракт червя ингибирует активность протеиназ кишечника на 45.4%, а PMSF – на 64.3% ($p < 0.05$).

Проверка гипотезы о специфичности ингибирующей способности *E. rugosum* по отношению к протеиназам хозяина показала, что экстракт червей ингибирует активность протеиназ не у всех исследованных видов рыб (Рис. 8). Так, добавление экстракта червей достоверно снижает активность протеиназ слизистой оболочки кишечника у трех из семи исследованных видов рыб: у хозяина – налима, а также у синца и леща ($p < 0.05$). В тоже время PMSF достоверно снижает активность протеиназ слизистой оболочки кишечника у всех исследованных видов рыб, за исключением судака. Следует отметить, что для слизистых оболочек кишечника налима, синца и леща не установлено достоверных различий в снижении протеолитической активности при использовании экстракта червей и PMSF, в то время как для остальных исследованных видов рыб PMSF снижал активность протеиназ в значительно большей степени, чем экстракт цестод (Рис. 8).

Следует также отметить, что при воздействии экстракта червей среднее значение процентного ингибирования для вида-хозяина (45.4%) было заметно выше по сравнению со средним уровнем для всех остальных видов рыб (31.0%). При использовании же PMSF, эти уровни были практически одинаковыми (64.3% и 64.4% соответственно). Согласно критерию Манна–Уитни, различия между сравниваемыми выборками были значимыми ($p < 0.05$) в первом случае (т.е. при воздействии экстракта червей) и недостоверными во втором (т.е. при воздействии PMSF). Эти данные также указывают на определенную степень специфичности ингибитора, продуцируемого червями, по отношению к протеиназам хозяина, а также на его более выраженную селективность по сравнению с эффектом PMSF.

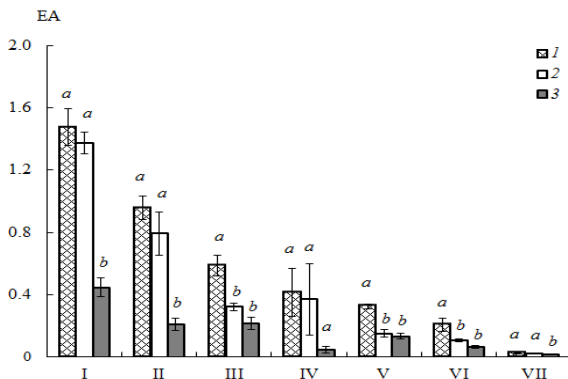


Рис. 8. Протеолитическая активность слизи оболочки кишечника различных видов рыб (1) и влияние на нее экстракта червей *E. rugosum* (2) и PMSF (3). I – форель (n=4), II – окунь (n=4), III – налим (n=5), IV – судак (n=4), V – синец (n=4), VI – лещ (n=3), VII – щука (n=3). Средние значения, обозначенные разными буквенными индексами (a и b), достоверно отличаются друг от друга ($p < 0.05$) для каждого отдельного вида рыб.

Согласно первоначальной рабочей гипотезе, предполагалось, что поскольку *E. rugosum* паразитирует только в кишечнике налима, выделяемый цестодой ингибитор может быть специфичным для протеиназ хозяина. Это предположение также опиралось на мнение некоторых авторов о том, что от ингибиторов протеиназ паразитов зависит специфичность паразита к хозяину (Hawley, Peanasky, 1992). Однако результаты проведенных исследований оказались не столь однозначными. С одной стороны, экстракт червя достоверно снижал активность протеиназ слизи оболочки кишечника не только налима, но также двух других видов рыб (синеца и леща). Это показывает, что специфичность исследуемого ингибитора в отношении протеиназ хозяина и других видов далеко не абсолютна. В то же время имеются определенные свидетельства частичной селективности данного ингибитора. Согласно результатам однофакторного дисперсионного анализа, ингибирующая способность экстракта червей достоверно зависела от вида исследуемых рыб, что также свидетельствует о селективном характере действия данного ингибитора.

Заключение по главе. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что цестоды обладают способностью ингибировать протеиназы хозяина и коммерческий препарат трипсина. Ингибирующей способностью в разной степени обладают как среда инкубации, так и экстракты исследованных цестод. Результаты опытов с *E. rugosum* и *T. nodulosus* позволяют сделать предположение, что выделение ингибиторов протеиназ не индуцируется присутствием протеиназ в среде, а их синтез осуществляется паразитом постоянно.

Снижение протеолитической активности слизи оболочки кишечника при использовании экстрактов цестод в качестве ингибитора сопоставимо с таковым при применении ингибитора сериновых протеиназ – PMSF, хотя доля ингибирования в первом случае несколько меньше, чем во втором.

Выявлено, что при инкубации живых *E. rugosum* в растворах трипсина различной концентрации активность последнего снижается. Степень снижения

активности трипсина зависит от его концентрации. Отсутствие заметного ингибирующего действия среды инкубации *E. rugosum* на активность трипсина может свидетельствовать о том, что ингибирующее действие цестод связано с адсорбцией фермента на поверхности тегумента. Экстракт *E. rugosum* ингибирует более 80% активности трипсина и около 50% протеолитической активности гомогената слизистой оболочки кишечника хозяина – налима. Ингибиторная активность червей не зависит от степени их зрелости. Несмотря на то, что полное ингибирование протеиназ хозяина не достигается, даже неполная инактивация протеолитических ферментов кишечника, и в частности, трипсина, обеспечивает резистентность гельминтов в их среде обитания.

Ингибирование экстрактом *E. rugosum* протеолитической активности слизистой оболочки кишечника у различных видов рыб свидетельствует об умеренной и вместе с тем достаточно отчетливо выраженной специфичности продуцируемого ингибитора по отношению к протеолитической активности хозяина.

Значение такой специфичности для отношений хозяина и паразита предстоит выяснить в дальнейших экспериментах на нескольких видах цестод с использованием выделенных и очищенных ингибиторов, а также с расширенным кругом видов рыб – как служащих хозяевами исследуемых цестод, так и используемых для сравнительного анализа.

ВЫВОДЫ

1. Заражение рыб цестодами в большей степени влияет на активность протеиназ, чем гликозидаз. Уровень влияния на исследованные показатели зависит от стадии развития цестод (плероцеркоид или зрелый червь) и их размера. Доля ингибирования активности протеиназ в зависимости от условий опыта и вида рыб составляет 39–89%.

2. У зараженных цестодами рыб в кишечнике изменяется спектр протеиназ: уменьшается доля сериновых (на 17–22%) и металлопротеиназ (на 63–100%).

3. В смывах с тегумента *T. nodulosus* большая доля протеолитической активности обнаружена в легко десорбируемой фракции, обусловленной главным образом сериновыми протеиназами (69%) и характеризующей активность ферментов хозяина. Высокий уровень этой активности указывает на высокую адсорбционную способность тегумента цестод, что может быть одной из причин снижения активности протеиназ в кишечнике хозяина.

4. Инкубация живых цестод *E. rugosum* в растворах коммерческого препарата трипсина различной концентрации вызывает снижение активности последнего на 60%.

5. Среда инкубации и экстракт исследованных видов цестод ингибируют активность коммерческого препарата трипсина на 10–86%. Как среда инкубации, так и экстракт исследованных видов червей в различной степени обладают ингибирующей способностью по отношению к протеиназам слизистой оболочки кишечника хозяина (ингибируют от 14 до 51% активности). Эффект ингибирующей способности червей сопоставим с аналогичным влиянием синтетического ингибитора PMSF.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Извекова Г.И., **Фролова Т.В.** Протеолитические ферменты и их ингибиторы у цестод // Успехи современной биологии. 2016. №4. С. 404–416.
2. Izvekova G. I., Kuklina M. M., **Frolova T. V.** Inactivation of Proteolytic Enzymes by Cestodes // Doklady Biological Sciences. 2017. Vol. 475. P. 161–164. (Scopus)
3. Izvekova G. I., **Frolova T. V.**, Zhokhov A. E. Proteinase Activity in the Intestine of Ruff *Gymnocephalus cernuus* (L.) (Pisces) Depending on the Sum Length of Cestodes *Proteocephalus cernuae* (Gmelin) Parasitizing the Gut // Inland Water Biology. 2018. Vol. 11. No. 1. P. 87–91. (WoS)
4. **Frolova T. V.**, Parshukov A. N., Izvekova G. I. Activity of Digestive Enzymes in Perch Infected with *Triaenophorus nodulosus* (Pallas) Plerocercoids // Inland Water Biology. 2018. Vol. 11. No. 4. P. 501–506. (WoS)
5. **Фролова Т. В.**, Извекова Г. И. Влияние заражения цестодой *Proteocephalus torulosus* Batch, 1786 на активность ферментов в кишечнике синца (*Ballerus ballerus* L.) // Паразитология. 2018. № 4 (54). С. 292–303.
6. Izvekova G. I., **Frolova T. V.**, Izvekov E. I., Parshukov A. N., Solovyev M. M. Effect of the *Eubothrium rugosum* (Cestoda) Extract on Intestinal Proteolytic Activity in Various Fish Species // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. 2019. Vol. 55. No. 1. P. 47–54. (WoS)
7. Izvekova G. I., **Frolova T. V.**, Izvekov E. I. Adsorption and inactivation of proteolytic enzymes by *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda) // Helminthologia. 2017. Vol. 54. No. 1. P. 3–10. (WoS)
8. Izvekova G. I., **Frolova T. V.**, Izvekov E. I. Inactivation of proteolytic enzymes by *Eubothrium rugosum* (Cestoda) from the gut of burbot *Lota lota* // Folia Parasitologica. 2017. 016 (64). P. 16–23. (WoS)

Материалы и тезисы научных мероприятий:

9. Извекова Г. И., Соловьев М. М., **Фролова Т. В.** Особенности влияния цестод на активность протеиназ кишечника хозяев – рыб // Новые знания о паразитах. Материалы V Межрегиональной конференции "Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке". Новосибирск. 2015. С. 51–52.
10. Извекова Г. И., **Фролова Т. В.** Протеолитические ферменты и их ингибиторы у цестод // Материалы VI Всероссийской конференции с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии». Севастополь. 2016. С. 75–77.
11. **Фролова Т. В.**, Г. И. Извекова. Инактивация протеолитических ферментов цестодой *Triaenophorus nodulosus* // Материалы VI Всероссийской конференции с международным участием «Школа по теоретической и морской паразитологии». Севастополь. 2016. С. 132–134.
12. **Фролова Т. В.** Влияние заражения цестодой *Proteocephalus cernuae* (Gmelin) на активность пищеварительных ферментов ерша *Gymnocephalus cernuus* (L.) (Pisces) // Материалы XVI Всероссийской молодежной гидробиологической конференции "Перспективы и проблемы современной гидробиологии". Борок. 2016. С. 197–198.

13. **Фролова Т. В.**, Жохов А. Е., Извекова Г. И. Влияние размера цестод *Proteocephalus cernuae* (Gmelin) на активность протеиназ в кишечнике ерша *Gymnocephalus cernuus* (L.) (Pisces) // Труды Центра паразитологии / Центр паразитологии Института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. М.: Наука. Т. XLIX: Фауна и экология паразитов / (отв. ред.: С.О. Мовсесян). М.: Товарищество научных изданий КМК. 2016. С. 184–185.

14. **Фролова Т. В.**, Извекова Г. И. Влияние заражения цестодой *Proteocephalus torulosus* на активность ферментов в кишечнике синца // Материалы VI Съезда Паразитологического общества: Международная конференция "Современная паразитология – основные тренды и вызовы. Санкт-Петербург. 2018. С. 248.

15. Извекова Г. И., Куклина М. М., **Фролова Т. В.** Инактивация протеаз цестодами в кишечнике позвоночных хозяев // Материалы VI Съезда Паразитологического общества: Международная конференция "Современная паразитология – основные тренды и вызовы. Санкт-Петербург. 2018. С. 99.