

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ВНУТРЕННИХ ВОД ИМ. И.Д. ПАПАНИНА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



ФРОЛОВА
Татьяна Викторовна

Активность пищеварительных ферментов рыб при заражении цестодами и
защита паразита от протеиназ хозяина

Специальность 03.02.04 – «Зоология»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель –
доктор биологических наук
Г.И. Извекова

СОДЕРЖАНИЕ

Общая характеристика работы	5
ГЛАВА 1. Обзор литературы	14
1.1. Влияние заражения цестодами на активность пищеварительных ферментов хозяев	14
1.1.1. <i>Краткая характеристика протеиназ и гликозидаз</i>	14
1.1.2. <i>Краткая характеристика цестод и их взаимоотношений с окончательным хозяином</i>	15
1.2. Способность цестод к инактивации ферментов хозяев	21
1.2.1. <i>Краткая характеристика ингибиторов протеиназ</i>	21
1.2.2. <i>Ингибиторы протеиназ паразитарного происхождения</i>	22
1.2.3. <i>Ингибиторы протеиназ у цестод</i>	25
1.2.3.1. <i>Ингибиторы протеиназ у личинок цестод</i>	26
1.2.3.2. <i>Ингибиторы протеиназ у взрослых цестод</i>	30
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования	35
2.1. Характеристика объектов исследования	35
2.2. Приготовление препаратов для исследования	40
2.2.1. <i>Приготовление гомогената слизистой оболочки кишечника рыб</i>	40
2.2.2. <i>Приготовление экстрактов цестод</i>	41
2.3. Метод десорбции ферментов при исследовании адсорбционной способности цестод	41
2.4. Методы исследования ферментативной активности	42
2.4.1. <i>Исследование активности гликозидаз</i>	42
2.4.2. <i>Исследование активности протеиназ и их спектра</i>	42
2.5. Исследование ингибирующей способности цестод	43
2.5.1. <i>Приготовление препаратов для определения ингибирующей способности цестод</i>	43

2.5.2. Ингибирование трипсина живыми червями	44
2.5.3. Определение ингибирующей способности	44
2.6. Определение количества белка в образцах	45
2.7. Количественная оценка видовой селективности ингибиторов	45
2.8. Статистическая обработка данных	46
ГЛАВА 3. Активность пищеварительных ферментов хозяина при заражении цестодами	47
3.1. Синец – <i>Proteocephalus torulosus</i>	47
3.2. Ерш – <i>Proteocephalus cernuae</i>	52
3.3. Окунь – плероцеркоиды <i>Triaenophorus nodulosus</i>	58
3.4. Адсорбция ферментов хозяина на пищеварительно-транспортной поверхности цестод (на примере <i>T. nodulosus</i>)	66
Заключение по главе	68
ГЛАВА 4. Инактивация протеолитических ферментов рыб цестодами	70
4.1. <i>Eubothrium rigosum</i>	70
4.1.1. Инактивация трипсина живыми червями <i>E. rigosum</i>	70
4.1.2. Масса цестод и содержание белка в препаратах <i>E. rigosum</i>	71
4.1.3. Ингибирующая способность среды инкубации цестод <i>E. rigosum</i>	72
4.1.4. Ингибирующая способность экстракта цестод <i>E. rigosum</i>	74
4.1.5. Влияние экстракта червей <i>E. rigosum</i> на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника налима	79
4.1.6. Влияние экстракта <i>E. rigosum</i>	

<i>на протеолитическую активность в гомогенате слизистой оболочки кишечника различных видов рыб</i>	82
<i>4.1.7. Сравнение ингибирующей способности экстракта E. rugosum и PMSF</i>	88
<i>4.2. Triaenophorus nodulosus</i>	90
<i>4.3. Proteocephalus torulosus</i>	94
Заключение по главе	97
ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ	99
ВЫВОДЫ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	105

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Одна из важнейших задач зоологии – изучение жизнедеятельности и поведения животных в разных условиях обитания. Внутриорганизменная среда представляет собой уникальную среду 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 приспособляется к конкретной среде обитания в организме хозяина, а тот, в свою очередь, приобретает функциональные свойства, обеспечивающие защиту от воздействия паразитарного фактора (Беэр, 2004). Для установления тесных специфичных взаимоотношений при попадании в организм хозяина паразит должен метаболически, физиологически и биохимически адаптироваться к жизни в этих условиях (Сергеева, Беэр, 2000). Адаптации к паразитическому образу жизни включают разнообразные виды специализации, связанные с изменением формы тела, физиологии и поведения, однако основные адаптации связаны с потреблением пищевых ресурсов (Halton, 1997).

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). Эти паразитические черви способны синтезировать собственные протеолитические ферменты (Polzer, Conradt, 1994; Yang et al., 2015), но

также могут использовать пищеварительные ферменты хозяина (Izvekova et al., 1997; Dalton et al., 2004). Прикрепляясь к стенке кишечника, черви повреждают эпителий, продуцируют и выделяют токсические вещества и при высокой интенсивности инвазии закупоривают просвет кишечника. Кроме этих повреждений существуют, несомненно, малоизученные формы воздействия паразита на организм хозяина, которые могут играть роль в патогенезе цестод. Исследования показателей пищеварительных ферментов кишечника рыб позволили установить, что паразитическая инфекция снижает активность кишечных протеиназ хозяина (Куровская, 1993; Извекова, Соловьев, 2012; Извекова, Куклина, 2014).

Кишечник позвоночных животных – идеальное окружение для населяющих его цестод, в то же время обитатели этой среды постоянно подвергаются потенциально деструктивному воздействию протеолитических ферментов. Кишечные паразиты менее подвержены воздействию со стороны иммунной системы хозяина, но должны противостоять действию пищеварительных ферментов. Один из главных механизмов защиты от протеиназ хозяина, наряду с выработкой муцина, – секреция ингибиторов (Шишова-Касаточкина, Павлов, 1969; Сопрунов, 1987; Pappas, Uglem, 1990). Концепции, что паразиты могут использовать ингибиторы протеиназ для выживания в хозяине, более 100 лет. Кроме того, в настоящее время становится очевидным, что ингибиторы паразита могут регулировать иммунный ответ хозяина (Кнох, 2007). 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* Rudolphi, 1819 или *H. microstoma* Dujardin, 1845, паразитирующих в кишечнике крыс (Pappas, Read, 1972 a; Pappas, 1978; Schroeder, Pappas, 1980; Schroeder et al., 1981; Pappas, 1987; Pappas, Uglem, 1990).

Если у нематод обнаружены ингибиторы всех классов протеиназ (аспартиловых, сериновых, цистеиновых и металлопротеиназ), которые встречаются на различных стадиях жизненного цикла паразитов (Delaney et al., 2005; Grasbergert et al., 1994; Shaw et al., 2003), то у цестод к настоящему времени установлено существование ингибиторов только сериновых протеиназ – трипсина и химотрипсина. Это может быть связано как с различиями в жизненном цикле этих групп гельминтов и соответственно барьерами, преодолеваемыми паразитами при проникновении в хозяина, так и с недостаточной изученностью ингибиторов цестод.

Кроме того, попытки обнаружить ингибирующую способность у цестод или выделить ингибиторы протеиназ у этих червей не всегда успешны. Так, не обнаружены ингибиторы протеиназ у цестод *Skrjabinia cesticillus* Molin, 1858 из кишечника кур, а также *Moniezia benedeni* Moniez, 1879 и *M. expansa* Rudolphi, 1810 из кишечника овец (Клименко, Кеняня, 1971), живые цестоды *M. expansa* не оказывали тормозящего действия на гидролиз казеина (Дубовская, 1973). В связи с этим высказано предположение, что выделяемый гельминтами ингибитор протеолитических ферментов не обладает достаточной активностью, способной обеспечить полную резистентность гельминтов (Шишова-Касаточкина, Леутская, 1979). Возможно, отрицательные результаты при исследовании ингибиторов протеиназ в этих работах связаны с несовершенством методов, что в отдельных случаях признается самими авторами (Клименко, Кеняня, 1971).

Данные, касающиеся ингибиторов протеиназ у цестод из рыб, единичны (Matskási, Juhász, 1977; Matskási, Németh, 1979). Имеются сведения о том, что неповрежденная цестода *Proteocephalus longicollis* Zeder, 1800 из

лососевых рыб секретирует в среду ингибитор трипсина (Reichenbach-Klinke, Reichenbach-Klinke, 1970: цит. по Pappas, Read, 1972 а). Установлено также, что экстракты, приготовленные из личинок и взрослых червей *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934, угнетали трипсиновую и химотрипсиновую активность кишечника карпа *in vitro* (Matskási, 1984). Накопление фактического материала по продуцированию ингибиторов протеиназ разными видами цестод, обитающими в кишечнике рыб, различающихся по типу питания весьма важно для поиска общих закономерностей и отличительных особенностей взаимоотношений в системе паразит–хозяин на физиолого-биохимическом уровне.

Актуальность работы обусловлена еще и тем фактом, что далеко не всегда при изучении пищеварительных процессов учитывается присутствие паразитов и их возможное влияние на эти процессы у позвоночных хозяев. Также как при изучении физиологии гельминтов, не всегда исследуют изменения в организме хозяина, вызываемые инфекцией. В то же время ключевое значение для понимания природы паразитизма имеет знание механизмов, с помощью которых паразиты влияют на утилизацию питательных веществ хозяевами.

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 *Triaenophorus nodulosus* Pallas, 1781 из кишечника щуки.

4. Установить способность живых цестод ингибировать активность коммерческого препарата трипсина в опытах *in vitro* на примере цестоды *Eubothrium rugosum* Batsch, 1786.

5. Выявить способность среды инкубации и экстракта цестод инактивировать протеолитические ферменты хозяина и коммерческий препарат трипсина и сравнить уровень влияния цестод на активность этих ферментов с аналогичным влиянием синтетического ингибитора сериновых протеиназ PMSF.

Научная новизна.

Впервые представлены данные о влиянии цестод, обитающих в кишечнике, на активность пищеварительных ферментов различных видов рыб, обнаружено влияние заражения на спектр протеиназ хозяев.

Впервые изучено влияние плероцеркоидов *T. nodulosus*, обитающих в печени, на активность пищеварительных гидролаз промежуточного хозяина – окуня старшей возрастной группы.

Впервые в экстрактах и средах инкубации 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. Работа над диссертацией позволила 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 149 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 заведующему лабораторией экологической паразитологии ИБВВ РАН им. И. Д. Папанина, д.б.н. А. Е. Жохову, предоставившему материал для исследований и оказавшему поддержку в ходе выполнения этой 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 и подготовке результатов исследований к публикации. 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Влияние заражения цестодами на активность пищеварительных ферментов хозяев

1.1.1. Краткая характеристика протеиназ и гликозидаз

Протеолитические ферменты, ферменты гидролизующие белки, подразделяют на сериновые, тиоловые (цистеиновые), кислые протеиназы и металлоферменты, содержащие в активном центре атом металла (чаще Zn^{2+}). К кислым протеиназам относится пепсин, функционирующий в желудке при низких значениях рН. Сериновые протеиназы – большой класс протеолитических ферментов, участвующих в пищеварении, коагуляции, иммунной и эндокринной и репродуктивной функциях (Morris, Sakanari, 1994). К сериновым протеиназам относятся, в частности, трипсин и химотрипсин, к металлоферментам – коллагеназа, большинство известных пептидаз и протеиназы, продуцируемые микроорганизмами, к цистеиновым протеиназам – внутриклеточный фермент катепсин В (Номенклатура ферментов, 1979).

Трипсин – одна из наиболее важных протеиназ кишечника, поскольку способен активировать другие кишечные гидролазы из неактивных зимогенов. Трипсиноген – неактивная форма трипсина – активируется кишечной энтерокиназой и трипсином, остальные протеиназы – только трипсином (Диксон, Уэбб, 1982).

В группу гликозидаз включают ферменты, осуществляющие гидролиз углеводов на разных этапах пищеварения, в частности, амилазы, глюкоамилазу, мальтазу и сахаразу (Номенклатура ферментов, 1979). Ферменты этой группы изучены наиболее полно, однако большинство работ посвящено исследованию амилаз (Голованова, Голованов, 2011; Кузьмина, 2015;). Амилазы расщепляют полисахариды до олиго- и моносахаридов на начальном этапе гидролиза углеводов. Большинство амилаз стабильно при

pH 5.5–8.0, максимальная активность наблюдается при нейтральных значениях pH (Кузьмина и др., 2003). Исследование амилаз из различных источников показало, что все они имеют участки с высокой степенью гомологии аминокислот, особенно в области активного центра. Это дает основание предполагать, что амилазы бактерий, растений и животных имеют общего предшественника (Meisler, Gumucio, 1986). Различают α - и γ -амилазы: α -амилаза является эндогидролазой и действует на 1,4- α -глюкозидные связи в молекулах полисахаридов, освобождая олигосахариды; γ -амилаза представляет собой экзогидролазу и последовательно отщепляет остатки глюкозы от конца молекул поли- и олигосахаридов. Она функционирует в составе макромолекулярных комплексов с мальтазой, а также с мальтазой и сахаразой (Диксон, Уэбб, 1982). Олигосахариды на следующих этапах пищеварения подвергаются воздействию кишечных гликозидаз – мальтазы, сахаразы и др., которые прочно связаны с апикальной мембраной энтероцитов (Уголев, Кузьмина, 1993).

1.1.2. Краткая характеристика цестод и их взаимоотношений с окончательным хозяином

Паразитизм – одно из интереснейших биологических явлений на Земле, которое характеризуется наличием подвижной равновесной системы двух организмов – паразита и хозяина. Для сохранения равновесия системы в ходе эволюции формируются приспособительные взаимоотношения между паразитическим организмом и хозяином, которые представляют собой многоступенчатые уровни всевозможных адаптаций паразита и хозяина (Малютина, 2008). В этой системе паразитический организм обладает своеобразным типом питания – исключительно за счёт хозяина.

Один из ярких примеров трофических взаимоотношений, складывающихся в системе паразит–хозяин, – паразитирование червей класса Cestoda в кишечнике позвоночных животных. У цестод в связи с отсутствием кишечника гидролиз и транспорт питательных веществ происходят на

поверхности тегумента. Длительная адаптация к эндопаразитизму сопровождалась постепенным переходом функции усвоения пищи от кишечника к покровам, тем более что у цестод установлены глубокая специализация поверхностных структур и совершенствование их трофической функции. При участии покровов осуществляется ряд физиологических и биохимических процессов, лежащих в основе сложных взаимодействий между цестодами и их хозяевами (Куперман, 1988; Izvekova et al, 1997). К настоящему времени накоплен богатый фактический материал, подтверждающий наличие у цестод таких ферментов, как амилаза, протеиназа, щелочная и кислая фосфатаза и др. (Дубовская, 1973; Шишова-Касаточкина, Леутская, 1979; Кузьмина, Куперман, 1983; Pappas, 1983; Куровская, 1991; Кузьмина и др., 2000; Dalton et al., 2004).

Цестоды – высокоспециализированные организмы, в биологии и морфологии которых проявляются многие важные черты адаптаций к паразитическому образу жизни. Как эндопаразиты, плоские черви обитают в среде, богатой легкодоступными низкомолекулярными субстратами. Наружный синцитиальный эпителий цестод (тегумент) – важный компонент поверхности раздела паразит–хозяин, осуществляющий опорную, секреторную, экскреторную, осморегуляторную, пищеварительную, адсорбционную и защитную функции (Pappas, Read, 1972 a, b; Куперман, 1988; Dalton et al., 2004). Система паразит – хозяин двойственна по своей сути. В процессе эволюции покровы гельминтов приобретают различные молекулярные механизмы агрессии и защиты, соответствующие оборонительным системам хозяина (Сопрунов, 1987). По мнению некоторых авторов, синцитиальный тегумент плоских червей дает важные преимущества для адаптации в кишечнике хозяина на границе раздела паразит – хозяин (Dalton et al., 2004).

Считается, что при оптимальных условиях паразиты незначительно влияют на физиологические характеристики хозяев, но могут быть важным фактором отбора в специфических условиях окружающей среды или при

стрессе. Так, в водной среде паразиты становятся значительным биотическим фактором естественного отбора при увеличении скорости течения или повышении температуры. Паразитарная нагрузка оказывает большое влияние на устойчивость к повышению окружающей температуры и на выносливость рыб (Lutterschmidt, 2007). Степень негативного воздействия паразита на процессы в организме хозяина определяется главным образом интенсивностью инвазии, общим состоянием организма хозяина и его возрастом, длительностью существования системы паразит–хозяин. Вместе с тем данные по исследованию патоморфологических аспектов взаимоотношений в системах цестоды–рыбы подтверждают общее положение об их зависимости от длительности совместной эволюции партнеров в системах паразит–хозяин. При сбалансированности отношений в такой системе частота встречаемости гельминта у хозяина, как правило, высока, а его патогенность минимальна (Пронина, Пронин, 1988; Извекова, 2001).

Гельминты, паразитирующие в желудочно–кишечном тракте позвоночных животных, часто служат причиной нарушений в обмене веществ организма хозяина. Изменение активности пищеварительных ферментов хозяина при заражении гельминтами неоднократно отмечалось при проведении исследований на рыбах (Pappas, Uglem, 1990; Извекова, 1991, 2003; Куровская, 1991; Кузьмина и др., 2000). Для цестод, паразитирующих в кишечнике, характерно активное взаимодействие с пищеварительной системой и влияние на нее в силу морфологического сходства их тегумента с энтероцитами кишечника (Куперман, 1988). Паразиты не только активно питаются за счет хозяев, провоцируя конкуренцию за пищевые ресурсы, но и вынуждены противостоять воздействию ферментов пищеварительного тракта. При этом, как правило, гельминты продуцируют и выделяют ряд химических веществ, ингибирующих ферменты слизистой оболочки кишечника хозяина, а также "маскирующих" наличие паразита за счет белковой мимикрии (Weiland, 1903,

цит. по Pappas, Uglem, 1990). У этих гельминтов отсутствует полостное пищеварение – первая стадия пищеварения, имеющаяся у позвоночных животных. Паразиты этой группы, обладая механизмами мембранного пищеварения и активного транспорта, способны использовать не только пищевые субстраты хозяина и продукты его первой стадии пищеварения, но также ферменты хозяина, адсорбированные на поверхности тела червей (Кузьмина и др., 2000; Halton, 1997; Dalton et al., 2004). Отмечена значительная активность полостных ферментов, адсорбированных на тегументе цестод, свидетельствующая о большой адсорбционной емкости пищеварительно-транспортной поверхности червей. Показано преобладание легкоадсорбируемых фракций, активность которых составляет 80–90% от общей протеолитической активности и до 35% от общей активности гликозидаз гельминтов (Izvekova et al., 1997; Извекова, 2006).

Работ по изучению влияния цестод на активность пищеварительных гидролаз хозяев немного (Куровская, 1991; Извекова, Соловьев, 2012; Извекова, Куклина, 2014). Главным образом подобные работы посвящены изучению влияния паразитарной инвазии на активность протеиназ и гликозидаз (Куклина и др., 2009; Извекова, Тютин, 2011; Куклина, Куклин, 2012; Matskasi, 1978, 1984) и полученные данные довольно противоречивы.

Так при изучении влияния цестод рода *Eubothrium* на жизнедеятельность хозяев–рыб одни авторы отмечают, что инвазия этими цестодами обычно не вызывает серьезной патологии у рыб, поскольку их выживание важно для завершения жизненного цикла паразита (Mitchell, 1993). Не найдено доказательств неблагоприятного действия *E. crassum* Bloch, 1779 и *Proteocephalus* sp. на поглощение питательных веществ у радужной форели *Oncorhynchus mykiss* (Ingham, Arme, 1973). Некоторые авторы считают, что цестоды, паразитирующие в кишечнике рыб, не влияют на хозяина, если потребности в пище удовлетворены, а кроме того, зараженные хозяева компенсируют негативное воздействие паразитов увеличением пищевой активности (Bosi et al., 2005). Другими же авторами

показано, что в кишечнике налима *Lota lota* при заражении цестодами *E. rugosum* активность протеиназ и гликозидаз слизистой оболочки кишечника налима снижается. Заражение сильнее сказывается на активности протеолитических ферментов, при этом активность пищеварительных ферментов хозяина снижается даже при низкой инвазии (Извекова, 2013).

Не выявлены различия в активности трипсина и общей протеолитической активности в кишечнике инфицированных и неинфицированных *H. diminuta* крыс (Pappas, 1978). Однако, по мнению авторов, небольшое количество фермента, инактивированного *H. diminuta*, может изменять «микроокружение» червя в тонком кишечнике хозяина, в то время как относительно большие количества фермента, присутствующие в норме в тонком кишечнике хозяина, маскируют инактивированный фермент (Pappas, 1980). Отмечено некоторое увеличение активности амилазы в кишечнике годовиков карпа *Cyprinus carpio*, зараженных *Bothriocephalus gowkongensis* Yeh, 1955 (Давыдов, Куровская, 1991). Активность протеиназ при этом оставалась без изменений. В тоже время при исследовании сеголетков карпа обнаружено достоверное снижение активности амилазы, протеиназы и кислой фосфатазы в слизистой кишечника и химусе при заражении рыб цестодами *B. acheilognathi*, причем активность амилазы и протеиназы, функционирующих в полости кишечника, изменяется в большей степени, чем активность ферментов, функционирующих в составе слизистой (Куровская, 1991).

Сравнительные исследования активности основных пищеварительных гидролаз у леща *Abramis brama*, зараженного и незараженного цестодами *Caryophyllaeus laticeps* Pallas, 1781, показали снижение активности протеиназ и липаз у зараженных особей. Кроме того, при заражении изменяется процентное соотношение активности различных подклассов протеиназ. У зараженных особей увеличивается относительное количество сериновых, особенно значительно цистеиновых и металлопротеиназ (Извекова и др., 2011).

Установлено влияние заражения цестодами *T. nodulosus* из кишечника щуки на активность гидролитических ферментов. У щук, зараженных цестодами, общая протеолитическая активность выше, чем у незараженных, в то время как на уровне активности амилазы, липаз и эстераз инвазия не влияет. Отмечено изменение соотношения уровней активности протеиназ и амилазы в кишечнике в сторону увеличения доли протеиназ (Извекова, Соловьев, 2012).

В сравнительных исследованиях взаимоотношений между цестодами и хозяевами, находящимися на разных ступенях эволюции (рыбы и птицы), обнаружена связь между строением прикрепительных образований цестод и активностью пищеварительных ферментов хозяев (Извекова, Куклина, 2014). Авторами показано, что уровни изменений активности пищеварительных ферментов при заражении у разных хозяев различны. У животных, зараженных цестодами без прикрепительных образований или с присасывательными аппаратами, снижается активность протеиназ и увеличивается коэффициент Г/П (отношение активностей гликозидаз к активности протеиназ) по сравнению с незараженными особями. Паразитирование цестод с заякоривающими прикрепительными образованиями, напротив, вызывает увеличение активности протеолитических ферментов хозяев и уменьшение коэффициента Г/П. Очевидно, обнаруженные различия связаны с характером повреждений слизистой кишечника прикрепительными образованиями цестод. При значительных повреждениях эпителия прикрепительными аппаратами цестод в просвет кишечника хозяина могут высвободиться внутриклеточные ферменты, главным образом катепсины.

В литературе имеются сообщения о том, что одной из причин снижения активности пищеварительных ферментов может быть влияние заражения цестодами на уровень регуляторного пептида бомбезина. Установлено, что заражение *E. crassum* радужной форели и *Cyathocephalus truncatus* (Pallas, 1781) кумжи вызывает значительное снижение количества

бомбезина (Bosi et al., 2005; Dezfuli et al., 2003). Бомбезин в желудочно-кишечном тракте стимулирует синтез и выделение гастрина, усиливает выделение ферментов поджелудочной железой (Балаболкин, 1998). Следует отметить, что большинство протеиназ и гликозидаз имеют панкреатическое происхождение (Уголев, 1985).

Таким образом, имеющиеся сведения о влиянии заражения цестодами на активность пищеварительных ферментов хозяев неоднозначны: исследователями отмечено как снижение активности ферментов в кишечнике хозяина вследствие гельминтной инвазии, так и ее повышение.

1.2. Способность цестод к инактивации ферментов хозяев

1.2.1. Краткая характеристика ингибиторов протеиназ

Ингибиторы протеиназ распространены повсеместно. Известны сотни белковых ингибиторов протеиназ, которым посвящены тысячи исследовательских работ (Rawlings et al., 2004). Они присутствуют в многочисленных формах в различных тканях животных, растений, а также у микроорганизмов. Ингибиторы протеиназ – важный природный инструмент регуляции протеолитической активности, предотвращающий нежелательный гидролиз белков. Довольно велико количество выделенных и описанных ингибиторов протеиназ белкового происхождения. Разнообразные ингибиторы группируются в белковые семейства (Laskowski, Kato, 1980), список которых с обнаружением новых ингибиторов растет и в связи с этим изменяется их классификация (Rawlings et al., 2004). По механизму действия ингибиторы делятся на 2 класса: необратимые и обратимые. Необратимые ингибиторы – серпины (ингибиторы сериновых протеиназ) и белки семейства макроглобулинов. К обратимым ингибиторам относятся цистатин, аспартил-протеиназные ингибиторы и ингибиторы металлопротеиназ (Кнох, 2007).

Серпины – большое семейство белков, ингибирующих сериновые протеиназы и играющих ключевую физиологическую роль в различных

биологических процессах, таких как свертывание крови, активации комплемента и воспаление (Dzik, 2006; Molehin et al., 2012). Среди ингибиторов сериновых протеиназ выделяют малые серин-протеиназные ингибиторы – смапины, которые в своем составе имеют менее 100 аминокислотных остатков.

Большинство известных и охарактеризованных белковых ингибиторов относятся к группе ингибиторов сериновых протеиназ (Molehin et al., 2012). Также обнаружено и изучено большое количество ингибиторов цистеиновых протеиназ (Kang et al., 2014), в то время как ингибиторов металло- и аспартил-протеиназ известно значительно меньше (Bode, Huber, 1992; Delaney et al., 2005).

1.2.2. Ингибиторы протеиназ паразитарного происхождения

Важная особенность адаптации гельминтов к условиям существования – двойственное отношение к протеиназам хозяина. Среда обитания, занимаемая многими взрослыми гельминтами, т.е. кишечник позвоночных, служит идеальным окружением, однако обитатели этой среды постоянно подвергаются потенциально деструктивному воздействию различных веществ, и в частности, протеолитических ферментов (Pappas, 1987). Кишечные паразиты менее подвержены действию иммунных систем хозяина, но должны противостоять действию пищеварительных ферментов (Сопрунов, 1987). При этом известно, что 1) только живые паразиты кишечного тракта устойчивы к действию пищеварительных ферментов, мертвые паразиты и даже слабо поврежденные быстро перевариваются; 2) паразиты могут быть устойчивы к протеолитическим ферментам в норме ассоциированным с тонким кишечником позвоночных, но не устойчивы к другим протеолитическим ферментам, например, протеиназам растительного происхождения; 3) изолированные поверхности паразитов теряют устойчивость к протеолитическим ферментам (Pappas, 1987). У гельминтов есть несколько механизмов защиты от протеиназ хозяина (секреция

ингибиторов, муцина, структура белковых молекул покровных тканей, специфичность действия ферментов и др.) (Шишова-Касаточкина, Павлов, 1969; Сопрунов, 1987; Pappas, Uglem, 1990).

Ингибиторы протеиназ паразитического происхождения известны много лет. Для выживания в организме хозяина паразитическим червям необходимо наличие специфических ингибиторов протеиназ, которые способны эффективно инактивировать протеиназы хозяина в их среде обитания (Hawley, Peanasky, 1992). Ингибиторы протеиназ контролируют активность этих ферментов. Кроме того, они выполняют еще одну функцию – ингибиторы, также, как и протеиназы, могут принимать участие в отражении иммунной защиты хозяина (Dzik, 2006). Многие серпины идентифицированы у паразитических гельминтов. Предполагается, что они вовлечены в иммунную регуляцию и выживание паразита под воздействием иммунного ответа хозяина. В настоящее время различные классы ингибиторов протеиназ паразитарного происхождения идентифицированы и их биохимические свойства и потенциальная роль в физиологии паразита и его выживании в хозяине охарактеризованы (Zang, Maizels 2001; Knox 2007; Hwang et al. 2009; Kang et al., 2014 и др.).

Существует предположение, что от ингибиторов протеиназ паразитов зависит специфичность паразита к хозяину (Hawley, Peanasky, 1992). Известно большое количество ингибиторов протеиназ, в том числе паразитарного происхождения, которые могут использоваться в медицине, сельском хозяйстве и биотехнологии (Knox, 2007).

Ингибиторы сериновых протеиназ – один из ключевых компонентов среди секреторных продуктов паразитов. Они играют важную роль в выживании паразита за счет способности ингибировать ферменты хозяина и в норме присутствуют в микроокружении и/или секретируются иммунными эффекторными клетками (Zang, Maizels, 2001). Эти ингибиторы регулируют активность протеиназ и контролируют разнообразные процессы, связанные с их активностью, в том числе они играют существенную роль в защите

паразита от пищеварительных ферментов хозяина и вносят вклад в специфичность паразитирования (Morris, Sakanari, 1994).

Регуляция активности протеиназ осуществляется самыми разными эндогенными ингибиторами. Обнаружены ингибиторы, синтезируемые самим паразитом, определены их свойства и потенциальная роль в физиологии паразита и его выживании в организме хозяина (Shaw et al., 2003). Исследована структура некоторых ингибиторов протеиназ нематод (Grasberger et al., 1994; Zang, Maizels 2001; Jin et al., 2011), трематод (Hwang et al., 2009; Kang et al., 2014) и цестод (Baig et al., 2005; Li et al., 2006).

Низкомолекулярные белки, выделенные из некоторых нематод, могут инактивировать большинство протеиназ, присутствующих в окружении червей. Возможно, специфичность нематод к хозяину связана с эффективностью их ингибиторов (Hawley et al., 1994). Очевидно, ингибиторы протеиназ играют важную защитную роль для многих видов паразитов, позволяя им существовать длительный период в организме хозяина (Suquet et al., 1984). Следует отметить, что растительная протеиназа, папаин, разрушает червей и не ингибируется никакими ингибиторами паразитарного происхождения (Martzen et al., 1985; Pappas, 1987). Кроме того, известно, что ингибиторы протеиназ секретируются в окружающую среду в незначительных количествах (Martzen et al., 1985).

Есть доказательства, что нематоды используют ингибиторы для защиты от протеиназ хозяина и манипуляции его поведением. Обнаружено, что эти паразиты продуцируют ингибиторы четырех классов протеиназ: сериновые (Ansari et al., 1976; Martzen, Peanasky 1985; Hawley, 1992), цистеиновые (Shaw et al., 2003), аспартат- (Kageyama, 1998; Delaney et al., 2005) и металлопротеиназы (Кнох, 2007).

Такие ингибиторы, как серпины и смапины, идентифицированы у *Ascaris spp.*, *Brugia malayi*, *Ancylostoma caninum*, *Onchocerca volvulus*, *Haemonchus contortus*, *Trichinella spiralis*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Anisakis*

simplex, *Trichuris suis*, *Schistosoma spp.*, *Clonorchis sinensis*, *Paragonimus westermani* и *Echinococcus spp.* (Dzik, 2006; Molehin et al., 2012).

У аскарид, паразитирующих в кишечнике человека и свиньи, смапины защищают червя от протеолиза при воздействии пищеварительных ферментов хозяина. Эти ингибиторы локализуются на поверхности развивающихся яиц, личинок и эпителия кишечника червя. Соединяясь с протеиназами хозяина, они формируют инактивационный комплекс фермент – ингибитор. Возможно, что этот механизм не только защищает червя от неблагоприятной окружающей среды обитания, но и маскирует поверхность развивающихся личинок, позволяя им избегать воздействия со стороны иммунной системы хозяина и свободно перемещаться из кишечника в печень и легкие (Zang, Maizels, 2001; Dzik, 2006).

Многие виды цестод, трематод и нематод обладают специфическими ингибиторами трипсина и химотрипсина (Ansari et al., 1976; Suquet et al., 1984; Hwang et al., 2009). Присутствие ингибиторов сериновых протеиназ у нематод свидетельствует о раннем появлении этого важного регуляторного семейства ингибиторов в эволюции многоклеточных животных (Zang, Maizels, 2001).

Ингибиторы протеиназ, также, как и сами протеиназы, играют важную роль в жизненном цикле паразитов, их вирулентности и патогенезе (Rascón, McKerrow, 2013).

1.2.3. Ингибиторы протеиназ у цестод

В отличие от исследований, посвященных ингибиторам протеиназ у нематод и затрагивающих достаточно широкий круг этих паразитов, работ, касающихся ингибиторов цестод немного и список исследованных видов невелик (Таблица 1).

Если у нематод обнаружены ингибиторы всех классов протеиназ (аспартиловые, сериновые, цистеиновые и металлопротеиназы), которые встречаются на различных стадиях жизненного цикла паразитов, то для

цестод к настоящему времени установлено существование только ингибиторов сериновых протеиназ – трипсина и химотрипсина. Это может быть связано как с различиями в жизненном цикле этих групп гельминтов и соответственно барьерами, преодолеваемыми паразитами при проникновении в хозяина, так и с недостаточной изученностью ингибиторов цестод. Кроме того, попытки обнаружить ингибиторную активность у цестод или выделить ингибиторы протеиназ у этих червей не всегда успешны. Так, не обнаружены ингибиторы протеиназ у цестод *Skrjabinia cesticillus* из кишечника кур, а также *Moniezia benedeni* и *M. expansa* из кишечника овец (Клименко, Кеняня, 1971), живые цестоды *M. expansa* не оказывали тормозящего действия на гидролиз казеина (Дубовская, 1973). В связи с этим высказано предположение, что выделяемый гельминтами ингибитор протеолитических ферментов не обладает достаточной активностью, способной обеспечить полную резистентность гельминтов (Шишова-Касаточкина, Леутская, 1979). Возможно, отрицательные результаты при исследовании ингибиторов протеиназ в этих работах связаны с несовершенством методов, что в отдельных случаях, признается самими авторами (Клименко, Кеняня, 1971).

1.2.3.1. Ингибиторы протеиназ у личинок цестод

Установлено, что цестоды продуцируют ингибиторы протеиназ при локализации в полости тела позвоночных хозяев (Matskási, Juhász, 1977; Taylor, Hoole, 1994). Несколько работ посвящены исследованию ингибирующей способности плероцеркоидов из полости тела карповых рыб и взрослых *Ligula intestinalis* L., 1758 из кишечника рыбоядных птиц (Matskási, Juhász, 1977; Matskási, Németh, 1979; Taylor, Hoole, 1994).

Таблица 1. Цестоды, продуцирующие ингибиторы протеиназ

Цестода (стадия развития)	Хозяин (локализация)	Ингибируемый фермент	Источник
<i>Ligula intestinalis</i> (плероцеркоид)	рыба (полость тела)	трипсин, химотрипсин	Matskasi, Juhasz, 1977; Matskasi, Nemeth, 1979
<i>L. intestinalis</i>	птицы (кишечник)	трипсин, химотрипсин	Matskasi, Juhasz, 1977
<i>Bothriocephalus acheilognati</i>	рыба (кишечник)	трипсин, химотрипсин	Matskási, 1978, 1984
<i>Proteocephalus longicollis</i>	рыба (кишечник)	трипсин	Reichenbach-Klinke, Reichenbach-Klinke, 1970: цит. по Pappas, Read, 1972 a
<i>Echinococcus multilocularis</i> (онкосфера)		трипсин, эластаза	Merckelbach, Ruppel, 2007
<i>E. granulosus</i> (личинка – протосколекс)	собака (двенадцатиперстная кишка)	сериновые протеазы эластаза	González et al., 2009 Shepherd et al., 1991
<i>Taenia taeniaeformis</i> (плероцеркоид)	крыса (печень)	трипсин, химотрипсин	Leid et al., 1987 a, b; Suquet et al., 1984
<i>T. pisiformis</i> (плероцеркоид)	кролик (печень)	трипсин, химотрипсин	Németh et al., 1979; Németh, Juhász, 1980, 1981
<i>Hymenolepis diminuta</i>	крыса (кишечник)	трипсин, химотрипсин	Pappas, Read, 1972 a, b; Pappas, Uglem, 1990; Pappas, 1987; Schroeder et al., 1981

Исследованы некоторые характеристики (молекулярный вес, рН- и температурная зависимость) ингибиторов протеиназ из экстрактов плероцеркоидов *L. intestinalis*, обитающих в полости тела карповых рыб (Matskási, Németh, 1979). Авторы отмечают, что выделенный ингибитор не влиял на активность собственных протеиназ плероцеркоида, причем при хроматографии экстрактов червя на сефадексе ингибитор и протеолитические ферменты гельминта разделены друг от друга. Ингибиторный эффект всегда определялся как простой симметричный пик в зоне низкомолекулярной массы, в то время как протеолитическая активность определялась как две отдельные фракции в области с высокой молекулярной массой в хроматограмме (Matskási, Németh, 1979). Кроме того, показано, что ингибиторы протеиназ, выделенные из *L. intestinalis*, паразитирующей в полости тела плотвы и пескаря, подавляли пролиферацию лимфоцитов селезенки, свидетельствуя о своей роли в защите от иммунитета хозяина (Taylor, Hoole, 1994).

Более высокая ингибиторная активность отмечена в экстрактах плероцеркоидов *L. intestinalis*, чем в среде культивирования. В тоже время экстракты плероцеркоидов содержали меньшее количество ингибитора, чем экстракты взрослых паразитов из тонкого кишечника домашней утки (Matskási, Juhász, 1977). Авторы предположили, что такие различия могут быть связаны с условиями обитания этих стадий и защитой паразита от воздействия пищеварительных ферментов в тонком кишечнике птиц. Установлено, что панкреатические ферменты млекопитающих, добавленные к питательной среде, инактивируются инкубируемыми в ней живыми червями.

Значительное внимание при исследовании ингибиторов протеиназ у личинок цестод уделяется представителям родов *Taenia* и *Echinococcus*. Так в экстрактах половозрелых червей и в инкубационной среде плероцеркоидов (метацестоды) *T. pisiformis* Bloch, 1780, содержащихся *in vitro*, обнаружен ингибитор протеиназ. Ингибиторная активность проявлялась по отношению

к трипсину и химотрипсину быка, собаки и кролика (Németh et al., 1979). Однако этот ингибитор не влиял на гидролитическую активность субтилизина, эластазы, коллагеназы, пепсина, реннина и папаина. Установлено, что оба ингибирующих центра локализируются на одной и той же части молекулы ингибитора, образование комплекса между трипсином и химотрипсином и ингибитором происходит за 3–4 мин (Németh et al., 1979; Németh, Juhász, 1980, 1981). Из личинок *T. taeniaeformis* Batsch, 1786, паразитирующих в печени крысы, выделен ингибитор трипсина и химотрипсина, который подавляет активацию комплемента, тормозит пролиферацию лимфоцитов, блокирует продукцию цитокинов и препятствует функционированию нейтрофилов (Leid et al., 1987a, b).

Клонирована и секвенирована комплементарная ДНК (cDNA), кодирующая карбоксиконцевой остаток 12-kDa субъединицы антигена В *Echinococcus granulosus* Batsch, 1786 (Shepherd et al., 1991). Очищенный гелем 12-kDa антиген из природного очага инфекции *E. granulosus* подавлял активность эластазы, но не ингибировал трипсин или химотрипсин, что, по мнению авторов, доказывает паразитарное происхождение этого ингибитора протеиназ. Возможно, не связанная с анти-протеазной активностью, но потенциально важная функция 12-kDa антигена – способность ингибировать обновление нейтрофилов. Эта функция может быть важной для выживания паразита при иммунном ответе хозяина (Shepherd et al., 1991). Авторы указывают, что по способности ингибировать активность протеиназ и хемотаксис нейтрофилов хозяина этот антиген похож на белок, секретлируемый *T. taeniaeformis* (Leid et al., 1987 a, b). Присутствие этого перекрестно-реагирующего антигена в природной инфекции означает, что подобный механизм избегания защитной реакции хозяина может быть широко распространен при заражении цестодами и обеспечивает длительное существование этих паразитов *in vivo* (Shepherd et al., 1991).

Дальнейшие исследования позволили описать семейство из восьми ингибиторов Кунитц-типа (ингибиторов сериновых протеиназ) из

протосколексов *E. granulosus*, которые выделяются при попадании паразита в двенадцатиперстную кишку дефинитивного хозяина – собаки. Установлено, что некоторые из этих белков синтезируются еще до заражения окончательного хозяина и секретируются личинками червей (González et al., 2009). Авторы высказали предположение, что семейство ингибиторов может воздействовать на поверхность раздела паразит–хозяин и препятствовать иммунному ответу хозяина в самом начале инфекции. Полученные результаты указывают, что секреция белков Кунитца – важный этап в развитии *E. granulosus*, служащий для блокирования, в частности сериновых протеиназ в месте локализации личинки червя (González et al., 2009). Более того, авторы допустили, что семейство ингибиторов Кунитц-типа может быть отличительным признаком цестод, играющим важную роль при закреплении в кишечнике окончательного хозяина.

Еще у одного представителя рода *Echinococcus* – *E. multilocularis* Leuckart, 1863 определена ингибиторная активность внутриклеточного серпина по отношению к некоторым протеиназам (Merckelbach, Ruppel, 2007). Показано, что около 20% общего клеточного белка ингибировало трипсин и трипсино-подобный плазмин, а также панкреатическую эластазу свиньи и эластазу нейтрофилов человека. Авторы предположили, что если серпин *E. multilocularis* выделяется онкосферой в процессе инфицирования хозяина, то он должен быть способен блокировать протеолитическое действие его пищеварительных ферментов.

1.2.3.2. Ингибиторы протеиназ у взрослых цестод

Серия работ посвящена исследованию ингибирования активности протеиназ цестодой *H. diminuta*, паразитирующей в кишечнике крыс (Pappas, Read, 1972 a, b; Uglem, Just, 1983; Schroeder et al., 1981; Pappas, 1987; Pappas, Uglem, 1990). Установлено, что при 30-минутной инкубации *H. diminuta* инактивирует трипсин и химотрипсин, но эта инактивация не связана с секрецией ингибитора протеиназ или подкислением инкубационной среды

(Pappas, Read, 1972 a, b). Показано, что адсорбционная поверхность червей взаимодействует с ферментами хозяина, в результате чего изменяется их активность. Так, при инкубации *H. diminuta* с трипсином, α - и β -химотрипсином *in vitro* указанные ферменты инактивировались на поверхности червя (Pappas, Read, 1972 a, b). По данным этих авторов, инактивация трипсина и химитрипсина в большей степени зависела от массы червя, чем от площади его поверхности. Это связывают со сменой гликокаликса, происходящей у *H. diminuta* за 6 ч (Oaks, Lumsden, 1971). Кроме того, установлено, что инактивация ферментов – линейная функция количества червей. Присутствие экскреторных и/или секреторных продуктов или изменение рН среды, очевидно, не инактивируют фермент. При низких значениях рН активность трипсина незначительно уменьшается в присутствии червей (Pappas, Read, 1972 a). Важно отметить, что при низкой концентрации фермента процент его инактивации значительно выше, чем при высокой. Увеличение количества присутствующего фермента приводило к уменьшению процента инактивации, но не к увеличению абсолютного количества инактивированного фермента. Инактивация прогрессировала со временем, даже если червей периодически переносили в свежий раствор фермента. Трипсин инактивировался интактной *H. diminuta*, однако авторам не удалось обнаружить секрецию активного ингибитора в окружающую среду (Pappas, Read, 1972 a). Установлено, что инактивация трипсина, α - и β -химотрипсина зависела от периода экспозиции червей в ферменте. Очевидно, она была необратима и не зависела от природы субстрата. Хотя инактивация трипсина и химотрипсина сходны, было высказано предположение, что это отдельные процессы. Это предположение основано на существовании различных оптимумов рН для инактивации исследованных ферментов. В то время как инактивация трипсина отмечена при определенном оптимуме рН в слегка щелочной зоне, оптимум инактивации химотрипсинов наблюдался в более широкой области рН (6.3–7.5) (Pappas, Read, 1972 b).

Исследование ингибирующей способности *H. diminuta* получило дальнейшее развитие в более поздних работах (Schroeder, Pappas, 1980; Schroeder et al., 1981; Uglem, Just, 1983; Pappas, 1987; Pappas, Uglem, 1990). Показано, что при 2-часовой инкубации *in vitro* цестода выделяет белки, которые ингибируют активность трипсина (Uglem, Just, 1983). Авторы назвали эти белки антиферментами, а также предположили существование неспецифических макромолекул, снижающих активность трипсина. Кроме того, было установлено, что солевой раствор с исходными значениями рН от 5.5 до 10.0 подкисляется червями до рН 5.0. Поскольку активность трипсина ингибируется при рН 5.0, было высказано мнение, что кишечные паразиты могут защищать себя от переваривания ферментами хозяина как путем регуляции рН окружающей среды, так и за счет выделения ингибиторов трипсина, или с помощью обоих механизмов (Uglem, Just, 1983). Повышение устойчивости к потенциально деструктивному воздействию ферментов хозяина – основная задача, с которой сталкиваются все кишечные паразиты. Возможно, способность *H. diminuta* ингибировать протеиназы и подкислять среду выделяющимися органическими кислотами обеспечивает решение этой задачи (Pappas, Uglem, 1990).

Взаимодействие трипсина с поверхностью *H. diminuta* приводит к необратимой инактивации фермента, очевидно не зависящей от его адсорбции. Установлено, что трипсин скорее адсорбируется на поверхности червя, чем поглощается им, однако адсорбция фермента не связана с его инактивацией (Schroeder, Pappas, 1980). Выдвинуто предположение о присутствии инактиваторов, связывающих ферментные контакты трипсина на поверхности червя. По-видимому, инактивация сопровождается небольшими структурными или конформационными изменениями фермента, затрагивающими только его активность в отношении высокомолекулярных субстратов, поскольку инактивированный фермент полностью сохраняет активность по отношению к низкомолекулярным субстратам (Schroeder, Pappas, 1980; Schroeder et al., 1981). Изменения могут быть результатом

смеси, содержащей полностью активные и инактивированные молекулы фермента, или гетерогенной смеси из различной степени модифицированных молекул. Механизм этих изменений неизвестен, но, очевидно, специфичен для трипсина, поскольку другие протеолитические ферменты (субтилизин, пепсин и папаин) не инактивируются (Schroeder et al., 1981).

Известно, что *H. diminuta* при инкубации *in vitro* выделяет в окружающую среду различные продукты, в том числе значительное количество белка и органические кислоты, которые считаются нормальными продуктами обмена гельминтов (Barrett, Precious, 1995). Некоторое количество этого белка появляется в результате обновления наружной поверхности тегумента червей и осаждается центрифугированием (Oaks et al., 1977). Однако показано, что нерастворимая фракция изолированной щеточной каймы тегумента *H. diminuta* не ингибирует бычий трипсин (Pappas, 1987). В тоже время было установлено, что изолированная мембрана тегумента *H. diminuta* не устойчива к действию протеолитических ферментов и не влияет на их активность (Pappas, 1987). Автор высказывает предположение, что инактивация протеолитических ферментов требует метаболически активной, динамической мембраны, а изолированный препарат тегументальной мембраны не отвечает этим требованиям. Поскольку существует устойчивость интактных червей к протеиназам хозяев, отношения паразит–хозяин на молекулярном уровне являются более сложными, чем представляются (Pappas, 1987). Позже было обнаружено, что растворимая фракция изолированной щеточной каймы тегумента *H. diminuta* содержит вещества, ингибирующие протеолитическую и амидазную активность бычьего трипсина и некоторые протеолитические ферменты тонкого кишечника хозяина (Pappas, Uglem, 1990). В этой же работе показано, что выделение ингибитора не индуцируется присутствием протеиназ в среде. Поскольку в тонком кишечнике крысы присутствуют различные протеиназы и ингибиторами червя ингибируется до 90% протеолитической активности тонкого кишечника хозяина, авторы

предположили, что черви обладают набором различных ингибиторов, с помощью которых, однако, не достигается полное ингибирование протеиназ хозяина. Ингибитор имеет высокое сродство и возможно большую специфичность к протеиназам тонкого кишечника хозяина – крысы, по сравнению с бычьим трипсином (Pappas, Uglem, 1990).

Помимо работ, связанных с изучением способности *H. diminuta* ингибировать протеиназы кишечника хозяина – крысы, небольшое число исследований посвящено определению возможности ингибировать протеиназы хозяина у цестод, обитающих в кишечнике рыб. Так есть сведения, что неповрежденная цестода *P. longicollis* из лососевых рыб секретирует в среду ингибитор трипсина (Reichenbach-Klinke, Reichenbach-Klinke, 1970: цит. по Pappas, Read, 1972 a). Установлено, что экстракты, приготовленные из личинок и взрослых червей *B. acheilognathi*, угнетали трипсиновую и химотрипсиновую активность кишечника карпа *in vitro* (Matskási, 1984).

Таким образом, цестоды, так же, как и другие паразитические черви, продуцируют ингибиторы протеиназ, без которых невозможно успешное осуществление жизненной стратегии паразитов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Характеристика объектов исследования

Исследовано 5 видов пресноводных костистых рыб (тип Vertebrata, кл. Osteichthyes), относящихся к 4 отрядам и 4 семействам, и 4 вида паразитических червей (тип Plathelminthes, кл. Cestoda), относящихся к 2 отрядам и 2 семействам (Таблица 2).

Таблица 2. 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</i> <i>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</i> <i>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</i> <i>nodulosus</i> – плероцеркоид, печень	отр. Bothriocephalidea, сем. Triaenophoridae
<i>Gymnocephalus</i> <i>cernuus</i> (Linnaeus, 1758) – ерш обыкновенный	отр. Perciformes – Окунеобразные, сем. Percidae	<i>Proteocephalus</i> <i>cernuae</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</i> <i>torulosus</i> Batsch, 1786 – взрослая особь, кишечник	отр. Onchoproteocephalidea, сем. Proteocephalidae

Triaenophorus nodulosus

Цестода *Triaenophorus nodulosus* – широко распространенный паразит рыб Голарктики. Биология вида, жизненный цикл, специфичность на разных фазах развития хорошо изучены (Куперман, 1973; Куперман, 1988; Пронина, Пронин, 1988). Жизненный цикл гельминта характеризуется сменой нескольких хозяев – окончательного и двух промежуточных, обитающих в водной среде. Первые промежуточные хозяева личиночных стадий паразита – веслоногие рачки отряда Соперода, вторые – разные виды рыб. В Рыбинском водохранилище, как и во многих других водоемах, основным вторым промежуточным хозяином *T. nodulosus* служит окунь *Perca fluviatilis* (Куперман, 1973). Окончательный хозяин *T. nodulosus* – щука обыкновенная *Esox lucius* L., в кишечнике которой паразит достигает половой зрелости. При этом развитие *T. nodulosus* в пищеварительном тракте имеет четкий годовой цикл (Куперман, 1973).

Плероцеркоиды *T. nodulosus*, окруженные капсулой, локализуются в печени окуня. Интенсивность инвазии в природных условиях не превышает 4 плероцеркоидов (чаще 1–2). Половозрелые особи *T. nodulosus* из кишечника щуки – длинные, лентовидные черви, наружное расчленение у них отсутствует. На стробиле хорошо заметна глубокая поперечная складчатость, что создает впечатление ложной сегментации. Длина стробилы *T. nodulosus* из щуки Рыбинского водохранилища колеблется от 65 до 380 мм. Прикрепительный аппарат этих цестод представлен сколексом с двумя псевдоботриями и двумя парами крючьев (Куперман, 1973).

Некоторые виды рода *Triaenophorus* представляют серьезную опасность для рыб, в ряде случаев вызывая на стадии плероцеркоида массовые заболевания и даже гибель ценных промысловых рыб, главным образом в прудовых хозяйствах (Куперман, 1973).

Eubothrium rugosum

Eubothrium rugosum – широко распространенный паразит, обитающий в кишечнике налима. Жизненный цикл протекает со сменой двух промежуточных хозяев. Процеркоиды развиваются в полости тела веслоногих ракообразных, плероцеркоиды – в кишечнике ерша *Gymnocephalus cernuus* или окуня *Perca fluviatilis* (Определитель... , 1987). В кишечнике налима в период с октября по июнь популяция *E. rugosum* представлена червями, находящимися на разных стадиях развития: половозрелые особи, взрослые с гонадами и особи без гонад. Значительная часть червей способна после частичной дестробиляции полностью регенерировать и вновь формировать инвазионные яйца (Куперман, 1978). Головной конец червей прикрепляется в пилорических придатках кишечника, а стробила выходит в его средний отдел. Длина зрелой стробилы 100–520 мм, сколекс удлинённый с простыми поверхностными, неглубокими ботриями. Наружная сегментация стробилы полная, отчетливая (Определитель... , 1987). Изучены жизненный цикл (Куперман, 1978) и ультраструктура (Куперман, 1988) этого паразита, некоторые биохимические показатели и аспекты взаимодействия *E. rugosum* и его хозяина – налима (Извекова, 1991, 1997; Izvekova et al., 1997; Извекова, 2003).

Proteocephalus cernuae

Proteocephalus cernuae – самый крупный представитель кишечных паразитов ерша *Gymnocephalus cernuus* (Жохов, 2010). Развитие на фазе процеркоида происходит в полости тела веслоногих ракообразных, фаза плероцеркоида – в кишечнике дефинитивного хозяина. Зрелые черви достигают 8 см в длину при максимальной ширине 3 мм, что вполне сопоставимо с длиной кишечника хозяина. Стробила имеет четкое расчленение. Проглоттиды протеоцефалюсов обычно сохраняются в течение всей жизни червя, поэтому стробила чаще всего представляет собой непрерывную цепь члеников, различающихся по степени развития гонад.

Сколекс округлой формы с четырьмя простыми присосками. Сколекс и шейка густо покрыты мелкими шипиками (Определитель... , 1987). Площадь поверхности тела этих цестод достаточно большая, поэтому они могут оказывать заметное влияние на жизнедеятельность хозяина.

Proteocephalus torulosus

Ленточный червь *Proteocephalus torulosus* широко распространен у карповых рыб Палеарктики (Фрезе, 1965). Подробно изучено развитие и созревание *P. torulosus* в промежуточном и окончательном хозяине (Kennedy, Hine, 1969; Scholz, 1989, 1993; Scholz, Moravec, 1994). Установлен сезонный цикл в росте и созревании этого гельминта. Развитие червя в дефинитивном хозяине происходит в зимне–весенний период. В начале лета гельминты покидают организм хозяина (Pietroock et al., 1998). Стадия процеркоида протекает в полости тела веслоногих ракообразных. Второй промежуточный хозяин в цикле развития *P. torulosus* отсутствует и стадия плероцеркоида проходит в теле дефинитивного хозяина (Kennedy, Hine, 1969). Прикрепительный аппарат цестоды представлен большим, часто вздутым сколексом, имеющим четыре мощные присоски. Сколекс, шейка и часть стробилы покрыты мелкими шипиками (Определитель... , 1987).

Сбор материала проводился весной 2015–2017 гг., 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 Ильдь 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.

Экспериментальная часть работы проведена в 2015–2018 гг. в лаборатории экологической паразитологии Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН. Сроки сбора материала связаны, в одних случаях, с сезонностью развития цестод в окончательном хозяине, в других – с возможностью отлова рыб (Таблица 3).

Таблица 3. Исследованные виды рыб

Вид рыб (n)*	Водоем	Время вылова	Размер рыб, см	Тип питания
налим <i>Lota lota</i> , n=25	Рыбинское водохранилище	апрель 2015, ноябрь 2015, февраль–апрель 2016	32–48	хищник – факультативный бентофаг
синец <i>Ballerus ballerus</i> , n=22	Рыбинское водохранилище	август 2016	19.5–30.1	планктофаг
щука <i>Esox lucius</i> , n=30	Рыбинское водохранилище	весна 2015, апрель–май 2016, весна 2017	31–68	хищник
окунь <i>Perca fluviatilis</i> , n=14	Ладожское озеро	сентябрь 2015 февраль 2016	14.5–28.1	хищник
ёрш <i>Gymnocephalus cernuus</i> , n=23	р. Ильдь, р. Чеснава (притоки Рыбинского водохранилища)		6.5–11.3	бентофаг

*n – число исследованных экземпляров данного вида

2.2 Приготовление препаратов для исследования

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.

2.2.1. Приготовление гомогената слизистой оболочки кишечника рыб

Кишечники рыб (от желудка или пилорических придатков до ануса, в зависимости от вида рыб) извлекали, освобождали от жира и препарировали – делали продольный разрез, извлекали червей, удаляли химус и скребком снимали слизистую оболочку. Кишечники ершей измеряли в соответствии с поставленными задачами. Слизистую оболочку кишечника рыб гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора фирмы Sartorius AG (Göttingen, Germany) и гомогенат разводили раствором Рингера для холоднокровных животных, pH 7.5 (6 г NaCl; 0.14 г KCl; 0.5 мл 10% CaCl₂; 0.54 г Na₂HPO₄; 0.02 г KH₂PO₄; 0.16 г MgSO₄ в 1 л дистиллированной воды) в массово-объемном соотношении 1:49. В опытах с окунем и ершом гомогенаты готовили из целых кишечников по причине сложности извлечения слизистой оболочки в достаточном количестве у данных видов рыб. 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.

Для проверки гипотезы о возможной специфичности ингибирующей способности червей *E. rugosum* по отношению к активности протеиназ налима готовили гомогенаты слизистой оболочки кишечника различных видов рыб. Помимо рыб, выступающих основными объектами исследования, для этого эксперимента были взяты судак *Sander lucioperca*, L. и лещ *Abramis brama*, L. из Рыбинского водохранилища, а также форель *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum из садков на Ладожском озере.

2.2.2. Приготовление экстрактов цестод

Извлеченных из кишечника хозяина цестод 3 раза тщательно промывали в 10 мл раствора Рингера с целью удаления ферментов хозяина, адсорбированных на их поверхности. После этого червей гомогенизировали с помощью стеклянного гомогенизатора и гомогенат разводили раствором Рингера в массово-объемном соотношении 1:9. Гомогенаты червей центрифугировали при 9000 об/мин в течение 5 мин при 4°C, отбирали полученный экстракт, замораживали и хранили его при –20°C для дальнейших биохимических исследований.

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.

2.3. 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.

2.4. Методы исследования ферментативной активности

2.4.1. Исследование активности гликозидаз

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)).

2.4.2. Исследование активности протеиназ и их спектра

Суммарную активность протеиназ в смывах с тегумента червей, гомогенате слизистой оболочки кишечника рыб (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 азоказеина в трис-буфере, рН 7.5 (Alarcón et al., 2002). Субстрат и ферментативно активный препарат инкубировали 60 мин при 20–22°C. Реакцию останавливали добавлением 0.3 М раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), образовавшийся осадок из негидролизованного белка удаляли центрифугированием при 9000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Интенсивность развивающегося окрашивания, пропорционального активности ферментов, измеряли в супернатанте при 440 нм на спектрофотометре Lambda 25 (PerkinElmer).

Идентификацию различных подклассов 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 комнатной температуре. 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.

2.5. Исследование ингибирующей способности цестод

2.5.1. Приготовление препаратов для определения ингибирующей способности цестод

В серии опытов по исследованию ингибирующей способности цестод использовали среды инкубации или экстракты *T. nodulosus*, *E. rugosum* и *P. torulosus*. Червей, отмытых от ферментов хозяина, помещали в новую порцию раствора Рингера и инкубировали в течение 24 ч при температуре

10°C. В течение всего времени инкубации черви оставались живыми. После инкубации в среде измеряли значения pH, червей гомогенизировали и готовили экстракт, как описано выше.

В зависимости от поставленных задач для различных видов червей применяли некоторые модификации. Так, извлеченных из кишечника 5 налимов и отмытых, как описано выше, червей условно делили на «коротких» (8 групп) и «длинных» (5 групп). Длина «коротких» червей составляла 5–7 см, «длинных» – 10–20 см. Число «коротких» в группе колебалось от 3 до 10, а «длинных» – от 1 до 3 штук.

В серии экспериментов по исследованию ингибирующей способности *P. torulosus* использовали только экстракт этих цестод, который получали по вышеописанной методике.

2.5.2. Ингибирование трипсина живыми червями

В опыте с инактивацией трипсина живыми червями (на примере *E. rugosum*) отмытые живые цестоды из 15 налимов были поделены на 16 групп. Масса червей в группах колебалась от 0.83 до 1.39 г. Все группы разделили на две серии по 8 групп. Каждую группу червей из первой серии помещали в 5 мл раствора трипсина в растворе Рингера концентрацией 0.005 мг/мл, а каждая группа из второй серии – в 5 мл раствора трипсина концентрацией 0.01 мг/мл. В опытах использовали коммерческий препарат свиного трипсина (MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA; activity 250 USP). 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.

2.5.3. Определение ингибирующей способности

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 (pH 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 комнатной температуре. Одновременно в соответствующую контрольную пробу добавляли аналогичный объем трис-буфера. После этой инкубации в пробах определяли протеолитическую активность как описано выше.

В зависимости от поставленных задач использовали различные объемы среды инкубации (50, 100 или 150 мкл) и экстракта (20, 50, 100 или 150 мкл) изученных цестод.

Для сравнения с уровнями ингибирующей способности препаратов исследованных цестод определяли ингибирующий эффект синтетического ингибитора сериновых протеиназ PMSF (фенил-метил-сульфонил-флуорид) в концентрации 100 мМ в DMSO (диметилсульфоксид) по отношению к протеолитической активности гомогената слизистой оболочки кишечника рыб и раствора трипсина.

2.6. Определение количества белка в образцах

В ряде опытов определяли содержание белка в среде инкубации и экстракте червей методом Лоури (Lowry et al., 1951).

2.7. 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 и 2) для более узкого круга из пяти хищных видов (т.е. за исключением леща и синца).

2.8. 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 $p=0.05$.

Ингибирующий эффект экстракта *E. rugosum* на протеиназы разных видов рыб оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Тьюки для множественного сравнения средних значений при $p<0.05$. Достоверность различий в эффективности ингибирования между экстрактом гельминта и синтетическим ингибитором RMSF 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

3.1. 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 (Рис. 1). 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. 2). 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 (Рис. 3). 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*.

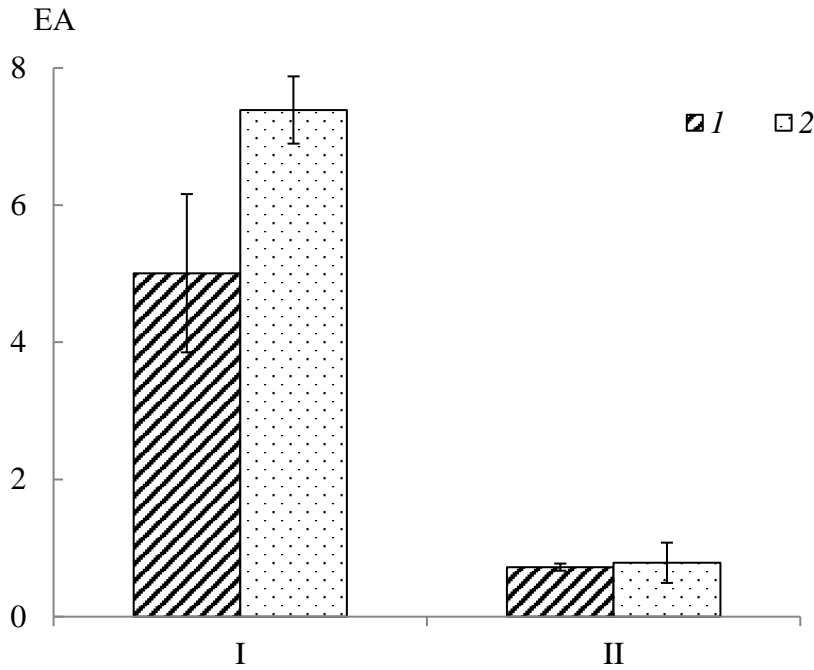


Рис. 1. Активность амилаз (I) и сахаразы (II) в слизистой оболочке кишечника синца в зависимости от заражения цестодами *P. torulosus*, мкмоль/(г × мин).

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

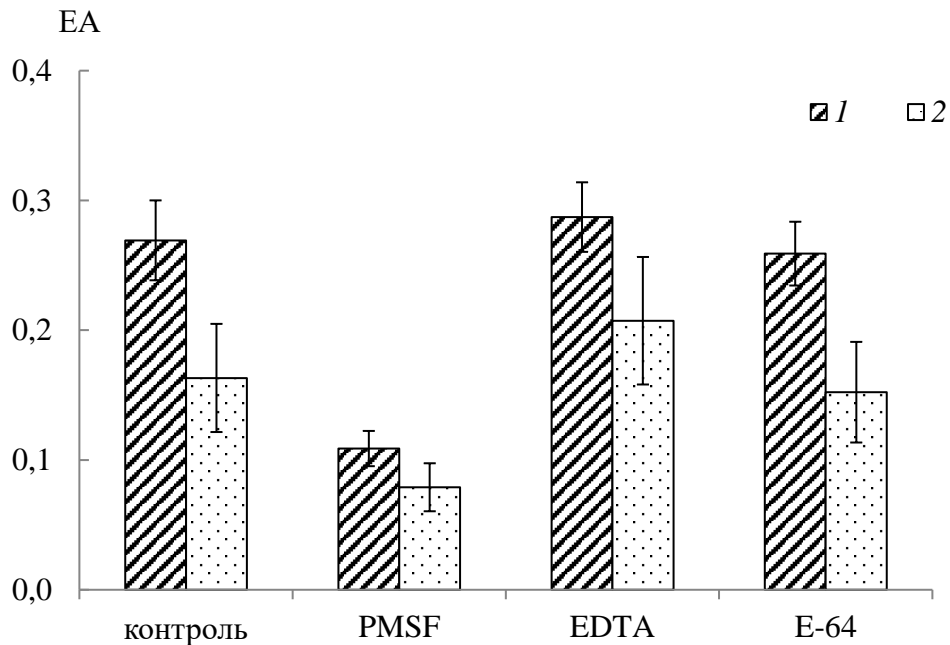


Рис. 2. Влияние заражения цестодами *P. torulosus* на протеолитическую активность и спектр протеиназ слизистой оболочки кишечника синца, $\Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$. PMSF – сериновые протеиназы, EDTA – металлопротеиназы, E-64 – цистеиновые протеиназы.

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

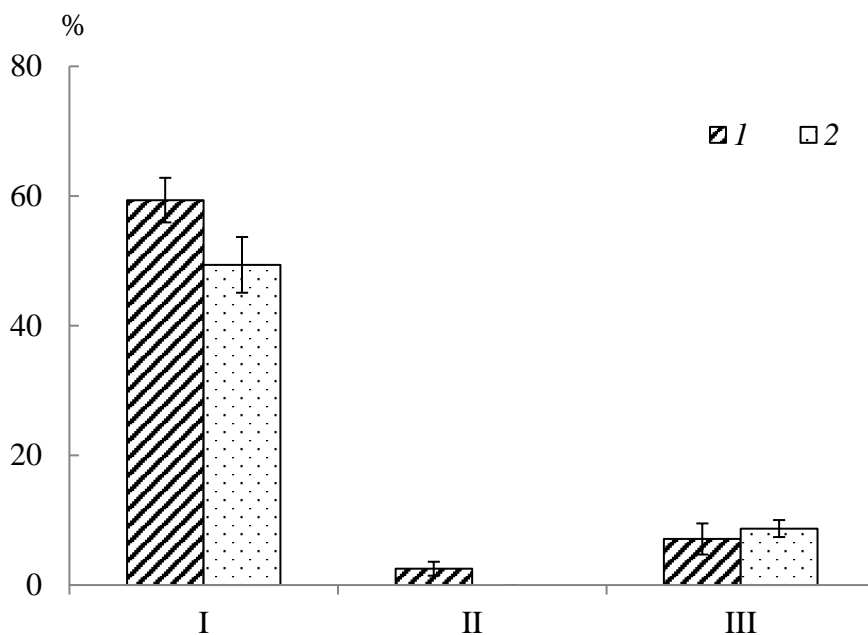


Рис. 3. Доля различных подклассов протеиназ в слизистой оболочке кишечника незараженных (1) и зараженных (2) цестодами *P. torulosus* синцов, %.

I – сериновые протеиназы, II – металлопротеиназы, III – цистеиновые протеиназы

Активность пищеварительных ферментов зависит от многих биотических и абиотических факторов, одним из которых является инвазия цестодами (Matskasi, 1984; Куровская, 1993; Извекова, Соловьев, 2012). Изменение активности пищеварительных ферментов позвоночных животных при гельминтозах отмечалось при проведении исследований на рыбах и птицах (Matskasi, 1984; Dalton et al., 2004; Куклина, Куклин, 2012). Так, установлено, что у заражённых цестодами *B. acheilognathi* карпов в кишечнике снижается активность как протеолитических, так и амилолитических ферментов на 35–50% и 47–63% соответственно (Куровская, 1991). В кишечнике леща и налима также отмечено снижение протеолитической активности при инвазии цестодами *C. laticeps* и *E. rugosum* соответственно. При этом активность пищеварительных ферментов хозяина снижается даже при низкой инвазии (Извекова, Соловьев, 2012; Извекова, 2013).

Данные, полученные при исследовании влияния гельминтной инвазии на пищеварительную активность у птиц, подтверждают снижение протеолитической активности в кишечнике моевок (*Rissa tridactyla* L.) при заражении цестодами *Tetrabothrius cylindraceus* Rudolphi, 1819 и *T. immerinus* Abildgaard, 1790 на 31–39% и снижение активности гликозидаз в кишечнике толстоклювой (*Uria lomvia* L.) и тонкоклювой (*U. aalge* Pontoppidan) кайр при заражении цестодами *T. jaegerskioeldi* Nybelin, 1916 и *Alcataenia armillaris* Rudolphi, 1810 на 35 и 57% соответственно (Куклина и др., 2009; Куклина, Куклин, 2012).

Увеличение амилолитической активности, отмеченное у синца при заражении *P. torulosus*, по всей видимости, является защитной реакцией организма хозяина на гельминтную инвазию. Повышение активности гликозидаз отмечено также у карпа при заражении цестодой *B. gowkongensis* (Куровская, 1991). Некоторые авторы считают, что при заражении цестодами происходит компенсация негативного воздействия паразитов увеличением пищевой активности хозяина (Bosi et al., 2005), что, в свою очередь, может быть причиной повышения активности пищеварительных ферментов и, в частности, гликозидаз. Кроме того, показано, что при заражении различными видами гельминтов, в том числе цестодами, в кишечнике рыб увеличивается количество слизистых клеток, продуцирующих муцин (Bosi et al., 2016). В свою очередь муцин характеризуется высоким содержанием углеводов (Кузьмина, 1995), что также может влиять на показатели активности гликозидаз у зараженных рыб.

Нами установлено, что протеиназы синца 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). Авторами были вычислены коэффициенты А/П (отношение активности амилазы к активности протеиназ) для леща и Г/П (отношение активности гликозидаз к активности протеиназ) для налима. Эти

коэффициенты у зараженных рыб по сравнению с незараженными выше, что свидетельствует об изменении соотношения уровней активности ферментов у зараженных рыб в сторону понижения доли протеиназ.

Одной из причин снижения протеолитической активности у зараженных хозяев может быть частичное ингибирование протеиназ на поверхности цестод. Наравне с секрецией муцина, структурой белковых молекул покровных тканей, специфичностью действия ферментов и наличием кутикулы, устойчивой к действию протеолитических ферментов, секреция ингибиторов протеиназ входит в ряд адаптаций гельминтов к существованию в агрессивной среде кишечника хозяина (Pappas, Uglem, 1990). В ходе экспериментов *in vitro* с *H. diminuta* показана инактивация небольшого количества трипсина и химотрипсина при добавлении экстракта цестод. Относительная ингибиторная активность снижалась при увеличении количества фермента. В опытах *in vivo* с живыми цестодами авторы не наблюдали инактивации ферментов, в связи с чем было сделано предположение, что ингибирование происходит в непосредственной близости с тегументом червя (Pappas, Uglem, 1990).

Присутствие цестод в кишечнике хозяина, помимо прочего, может вызывать серьезные повреждения эпителия прикрепительными аппаратами (Shostak, Dick, 1986) с высвобождением внутриклеточных, в том числе и лизосомальных ферментов (катепсинов) в просвет кишечника (Извекова, Куклина, 2014). Отмечено, что паразитирование ленточных червей *Alcataenia larina* Krabbe, 1869 приводит к довольно значительному увеличению активности протеолитических ферментов в слизистой оболочке кишечника хозяев – моевок, особенно при высокой интенсивности инвазии (Куклина, Куклин, 2011). Цестода *P. torulosus* обладает четырьмя мощными присосками, при этом сколекс, шейка и часть стробилы покрыты мелкими шипиками (Scholz et al., 1998). С этими морфологическими особенностями, по всей видимости, и связано небольшое увеличение доли цистеиновых протеиназ, выявленное ингибиторным анализом.

3.2. Ерш – *Proteocephalus cernuae*

Установлено, что у исследованных ершей в кишечнике обитают четыре вида гельминтов (Таблица 4). По обилию и встречаемости доминирует цестода *Proteocephalus cernuae*. Кроме того, эти цестоды имеют большие размеры по сравнению с другими паразитами, обитающими в кишечнике ерша. При этом, чем выше интенсивность инвазии, тем мельче черви, населяющие кишечник. Длина червей (232 экз.) колебалась от 0.2 до 8.0 см, преобладали неsegmentированные плероцеркоиды длиной 0.9 см. В отдельных экземплярах рыб присутствовали одновременно зрелые segmentированные цестоды (длиной 5–8 см), продуцирующие яйца, и незрелые плероцеркоиды (0.2–2.5 см).

Отловленные ерши 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 особи ершей, 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 ($Z= -3.00$, $p=0.0027$). Коэффициент $D_{\text{ч}}/D_{\text{к}}$ (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; $Z= -3.00$, $p=0.0027$).

В результате проведенных экспериментов установлено, что заражение ерша цестодой *P. cernuae* влияет на активность протеиназ кишечника хозяина (Рис. 4). Изменение активности различается для групп рыб II и III, т.е. зависит от коэффициента $D_{\text{ч}}/D_{\text{к}}$. Так, активность протеиназ у ершей группы II снижается ($Z=1.84$, $p=0.065$), группы III – повышается ($Z= -1.56$, $p=0.11$) по сравнению с аналогичным показателем у незараженных рыб группы I. В то же время различия активности протеиназ у ершей групп II и III более значимы ($Z= -3.00$, $p=0.0027$).

Таблица 4. Зараженность ерша *Gymnocephalus cernuae* кишечными паразитами в реках Ильдь и Чеснава

Вид паразита	Стадия зрелости	Э.И., %	И.И., экз.	Пределы, экз.
Trematoda				
<i>Bunodera luciopercae acerinae</i>	взрослый червь	47.6	3.2	1–18
Cestoda				
<i>Eubothrium rugosum</i>	личинка	2.4	1.5	1–2
<i>Proteocephalus cernuae</i>	взрослый червь	73.2	7.13	1–141
Nematoda				
<i>Camallanus truncatus</i>	взрослый червь	14.6	1.3	1–3

Примечание. Э.И. – экстенсивность инвазии, И.И. – средняя интенсивность инвазии.

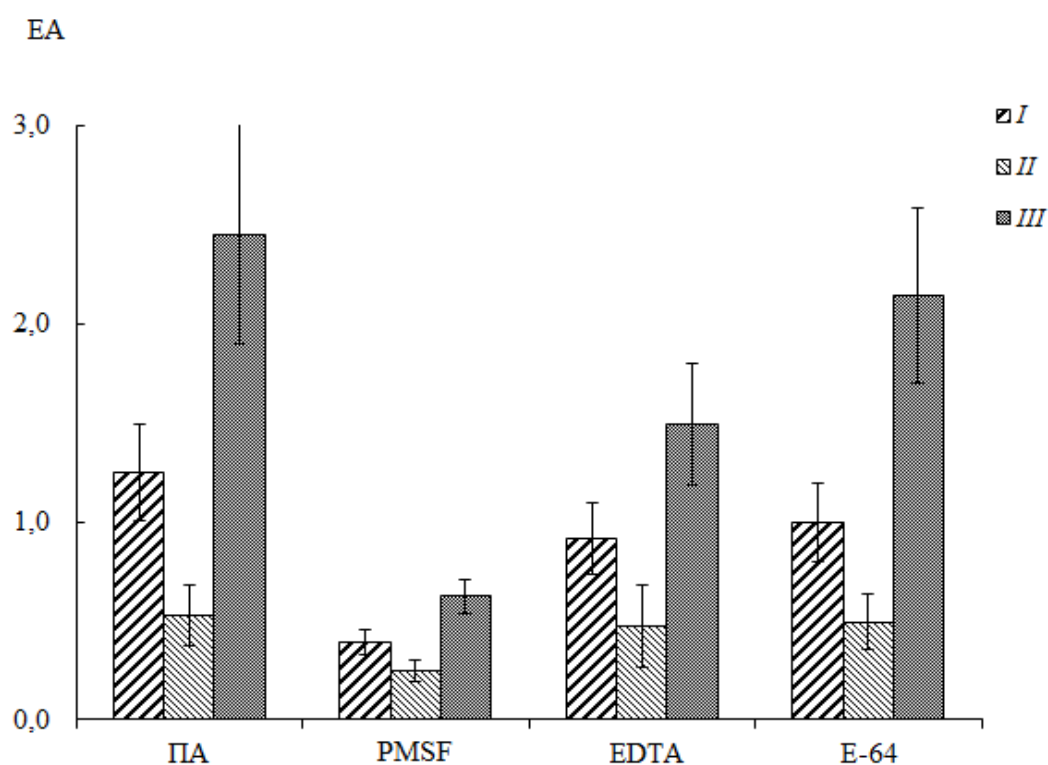


Рис. 4. Протеолитическая активность в кишечнике ерша в зависимости от зараженности рыб цестодой *P. cernuae* и влияние на нее различных ингибиторов, $\Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$. ПА – общая протеолитическая активность, PMSF – ингибитор сериновых протеиназ, EDTA – ингибитор металлопротеиназ, E-64 – ингибитор цистеиновых (тиоловых) протеиназ. I, II, III – группы рыб (пояснения в тексте).

Ингибиторы также по-разному влияли на активность протеиназ исследованных групп ершей (Рис. 4). В некоторых случаях полученные различия, согласно критерию Манна-Уитни, более значимы, чем для суммарной активности протеиназ (Таблица 5). Наиболее значимые различия получены при сравнении групп рыб II и III: во всех вариантах опытов эти различия достоверны при $p < 0.05$.

На основе полученных данных о влиянии ингибиторов на активность протеиназ вычислены доли различных подклассов протеиназ, функционирующих в кишечниках незараженных и зараженных ершей (Рис. 5). 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 ($Z=1.95$, $p=0.05$) и III ($Z=-2.43$, $p=0.015$). 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 ($Z=1.68$, $p=0.093$).

Ерш активно питается в течение всего года в любое время суток (Кияшко, 1982), что позволяет исследовать активность его пищеварительных гидролаз вне зависимости от времени года. Зараженность ерша цестодой *P. setipae* в Рыбинском водохранилище отмечена в течение всего года с максимумом в зимне-весенний период (Тютин, 2001). Этими двумя фактами определены сроки проведения работы. Опираясь на многолетние исследования динамики роста ершей Рыбинского водохранилища (Герасимов, 2015), можно с большой долей вероятности считать, что изученные ерши длиной 9.5 ± 0.1 см представлены особями в возрасте 2+–3+.

Таблица 5. Сравнение активности протеиназ в кишечниках ершей разных групп

Группа рыб		ПА	PMSF	ЭДТА	Е-64
I	II	<u>1.84</u> 0.065	<u>1.63</u> 0.10	<u>1.71</u> 0.09	<u>0.0</u> 1.0
II	III	<u>-3.00</u> 0.0027	<u>-2.86</u> 0.004	<u>-2.07</u> 0.04	<u>-2.86</u> 0.004
III	I	<u>-1.56</u> 0.11	<u>-2.05</u> 0.04	<u>-1.71</u> 0.09	<u>-2.15</u> 0.031

Примечание. Над чертой – критерий Манна-Уитни, под чертой – уровень значимости.

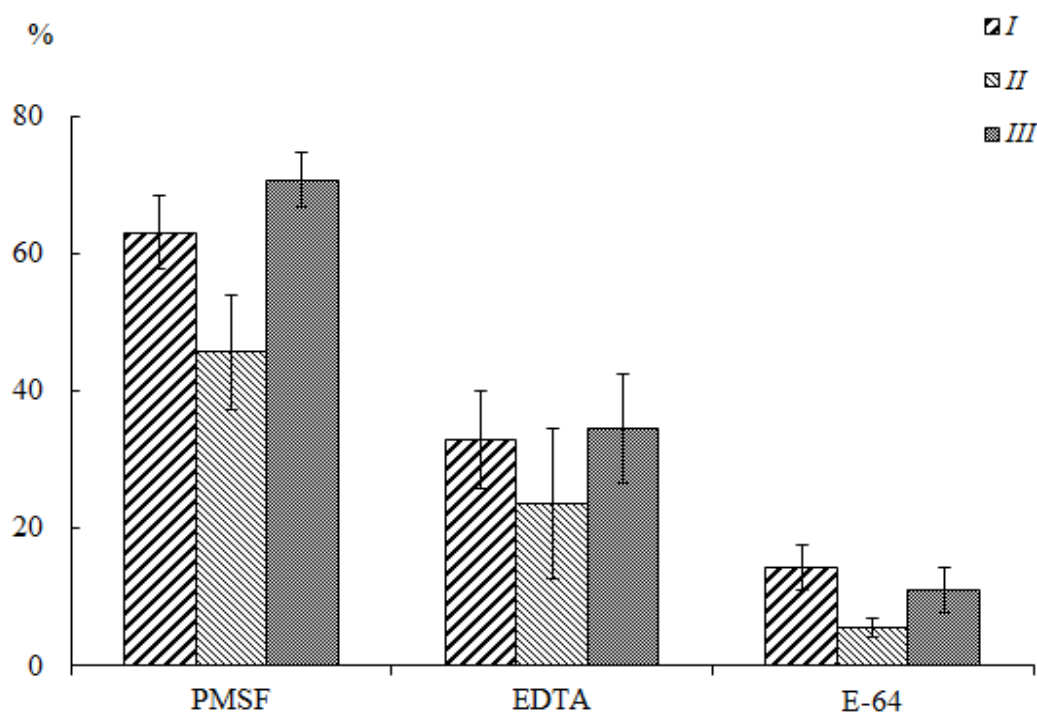


Рис. 5. Доля различных подклассов протеиназ в кишечнике ерша в зависимости от зараженности цестодой *P. cernuiae*, %.

Обозначения как на Рис. 4.

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 $D_{\text{ч}}/D_{\text{к}}$ 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. По нашему мнению, при оценке влияния зараженности на физиологические показатели хозяина размерно-массовые характеристики паразита более существенны, чем число червей, которые могут быть достаточно мелкими. С одной стороны, это подтверждается наблюдениями, показавшими большее влияние размера червей, чем их количества в одном ерше. Так, в группу II вошел ерш, зараженный 11 мелкими цестодами общей длиной 3.4 см, в группу III – ерш, зараженный одной крупной цестодой длиной 7.8 см. С другой стороны, это подтверждается данными об отсутствии корреляции между количеством червей и снижением скорости роста зараженных лососей (Saksvik et al., 2001). Последнее может быть связано с небольшими размерами червей при их большом количестве, поскольку авторы отмечают, что лососи были заражены от 1 до 87 экз. червей. Кроме того, известен “эффект скученности” у цестод, при котором средняя длина и масса, достигаемые отдельными червями, обратно пропорциональны числу присутствующих в хозяине червей, что, в свою очередь, сказывается на некоторых их физиологических показателях (Insler, Roberts, 1980).

У животных, зараженных обитающими в кишечнике цестодами без прикрепительных образований или с присасывательными аппаратами по сравнению с незараженными особями, снижается активность протеиназ (Извекова, Куклина, 2014). Прикрепительные образования *P. cernuae* представлены рудиментарной апикальной и четырьмя субапикальными присосками (Scholz, Hanzelová, 1998). Снижение активности протеиназ у рыб 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 $D_{ч}/D_{к}$ 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).

Один из информативных методов исследования протеиназ – ингибиторный анализ ферментов, позволяющий определить вклад различных подклассов протеиназ в общую протеолитическую активность, реализующуюся в пищеварительном тракте (Munilla-Morán, Saborido-Rey, 1996; Natalia et al., 2004; Siringan et al., 2006). Выявление относительной роли каждого фермента, участвующего в протеолитическом процессе, расширяет представления о гидролизе белков в пищеварительном тракте рыб.

Использование ингибиторного анализа позволило установить некоторые изменения в спектре протеиназ у зараженных по сравнению с незараженными цестодами ершей. Изменение долей сериновых протеиназ у зараженных рыб (понижение в группе II и увеличение в группе III) подтверждает предположение об адсорбции протеиназ на поверхности цестод у первых и повышении их синтеза у вторых. Это же предположение подтверждается изменением долей цистеиновых протеиназ при заражении. Поскольку доля цистеиновых протеиназ в большой степени связана с

лизосомальными ферментами, проявляющими активность, в частности, при повреждении слизистой кишечника прикрепительными аппаратами цестод (Высоцкая, Немова, 2008), незначительное изменение доли цистеиновых протеиназ у зараженных групп ершей свидетельствует об отсутствии серьезных повреждений кишечника при закреплении в нем *P. cernuae*. Значительная доля активности протеиназ кишечника ерша связана с металлопротеиназами, косвенно свидетельствуя о возможном вкладе микроорганизмов в пищеварение рыб.

3.3. Окунь – плероцеркоиды *Triaenophorus nodulosus*

Для биохимических исследований было отобрано 14 окуней, длина и масса которых составляли 19.32 ± 0.97 см и 150.84 ± 26.20 г соответственно. В печени пяти окуней ($n=5$) обнаружен плероцеркоид *T. nodulosus*. Длина и масса незараженных рыб ($n=9$) достоверно не отличались от таковых зараженных особей, соответственно для первых – 18.73 ± 0.96 см и 135.16 ± 21.98 г и для вторых – 20.4 ± 2.0 см и 179.08 ± 64.79 г.

Установлено, что активность протеиназ у незараженных рыб достоверно выше, чем у зараженных ($Z=2.373$, $p=0.018$). Кроме того, в зависимости от заражения по-разному сказывалось влияние ингибиторов на активность протеиназ (Рис. 6).

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%.

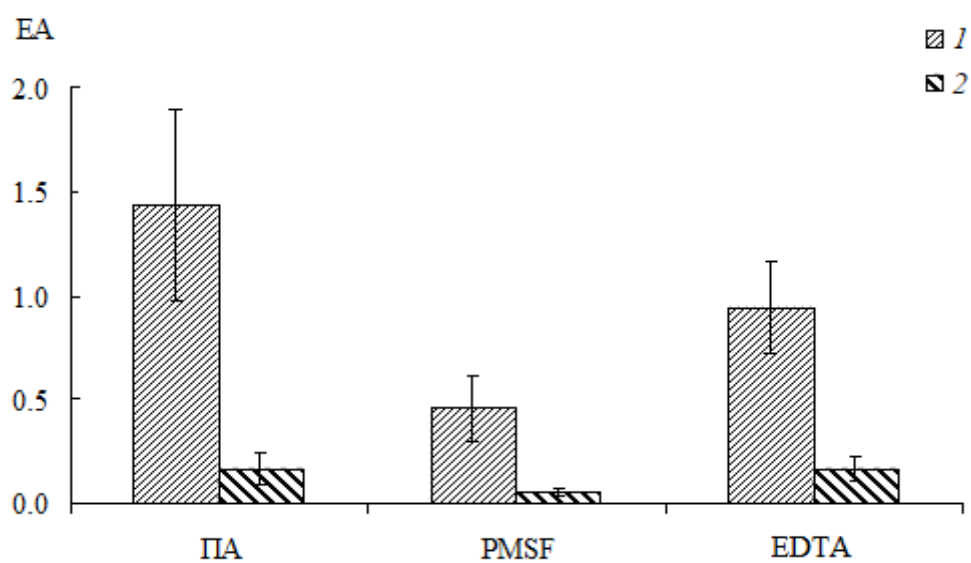


Рис. 6. Протеолитическая активность в кишечнике окуня в зависимости от заражения плероцеркоидами *T. nodulosus* и влияние на нее ингибиторов протеиназ, $\Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$.

ПА – общая протеолитическая активность, PMSF – ингибитор сериновых протеиназ, EDTA – ингибитор металлопротеиназ.

1 – незараженные особи, 2 – зараженные особи

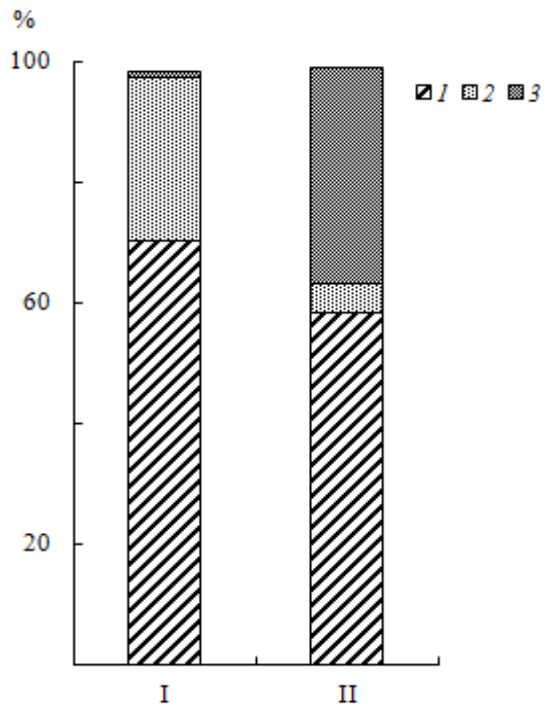


Рис. 7. Доли различных подклассов протеиназ в кишечнике окуня в зависимости от заражения плероцеркоидами *T. nodulosus*, %.

1 – сериновые протеиназы, 2 – металлопротеиназы, 3 – неидентифицированные протеиназы.

I – незараженные, II – зараженные

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 (Рис. 8).

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 6). 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.

Окунь – самый массовый вид Ладожского озера, имеет две экологические формы – прибрежную и глубинную (пелагическую), – различающиеся по спектру питания, темпу роста и плодовитости. В возрасте 4+–5+ он достигает размера 19–22 см (Дятлов, 2002).

В Рыбинском водохранилище также обитают две экологические формы окуня (пелагическая и литоральная), различающиеся пространственным распределением, численностью, коммерческой ценностью и доступностью для промысла. Размеры окуня могут различаться у пелагической и литоральной группировок, длины 23–24 см он достигает в возрасте 3+–4+ (Герасимов и др., 2015).

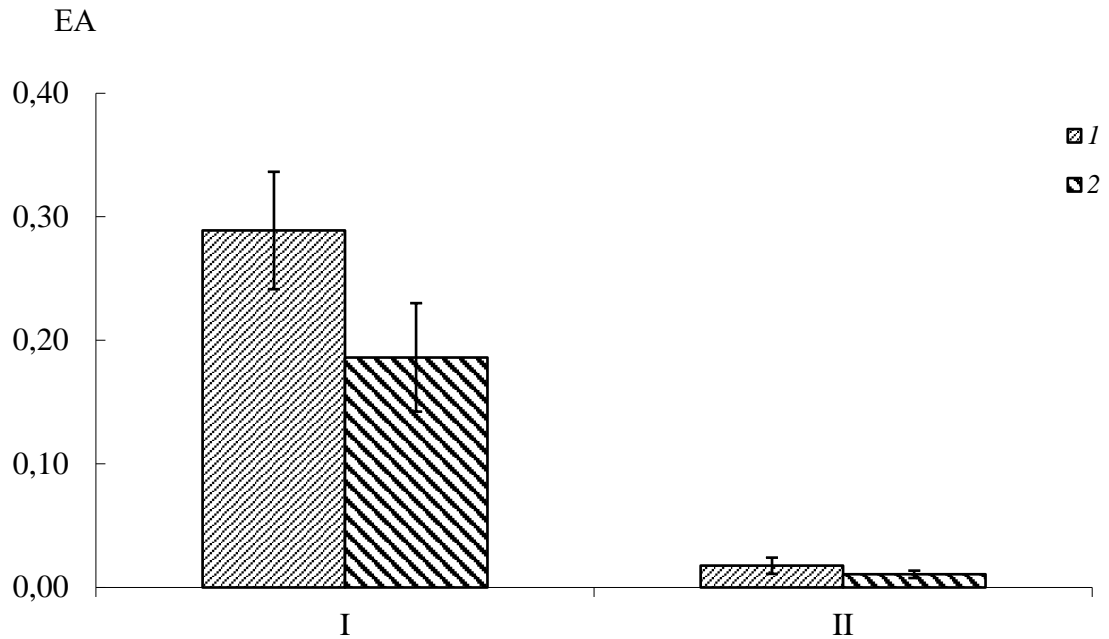


Рис. 8. Активность гликозидаз в кишечнике окуня в зависимости от заражения плероцеркоидами *T. nodulosus*, мкмоль/(г × мин).

I – активность амилаз, II – активность сахаразы.

1 – незараженные особи, 2 – зараженные особи

Таблица 6. 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.

Отдельными авторами на больших выборках окуня из бассейна оз. Байкал отмечена тенденция к снижению размеров и массы зараженных *T. nodulosus* окуней разных возрастов по сравнению с незараженными (Пронина, Пронин, 1988). В небольших выборках разница была несущественной, но с увеличением числа исследованных особей возрастала. Возможно, отсутствие размерно-массовых различий между незараженными и зараженными окунями в нашем исследовании связано с небольшой выборкой. В озерах Карелии окунь, как основной объект в рационе щуки наряду с ершом, играет ведущую роль в поддержании численности *T. nodulosus*, а окуни старших возрастных групп, ведущие хищный образ жизни, служат резервуарными хозяевами для *T. nodulosus* (Аникиева, Румянцев, 2005).

Плероцеркоиды локализуются в печени, где происходит инкапсуляция паразита путем разрастания соединительной ткани вокруг него. Образование капсулы – защитная реакция хозяина на внедрение паразита (Куперман, 1973). По некоторым данным (Izvekova, Tyutin, 2014), плероцеркоиды в печени окуня могут жить не более двух лет. Отмечен разный уровень взаимной адаптации плероцеркоидов с хозяином в различных популяциях окуня, что определяется типом циркуляции гельминта в конкретных экосистемах (Пронина, Пронин, 1988). Ответная реакция хозяев имеет прямую, но не пропорциональную связь с интенсивностью инвазии: чем менее специфичен паразит для хозяина, тем более сильные патологические изменения он вызывает даже при низкой интенсивности инвазии (Куровская, 1991). Благодаря высокой активности стенок капсулы, образующейся вокруг паразита в печени хозяина, и обилию капилляров она играет роль полупроницаемой оболочки, которая, с одной стороны, обеспечивает благоприятные условия для питания, роста и развития паразита, с другой – надежно защищает от его воздействия ткани хозяина (Куперман, 1973).

Установлено (Извекова, 2001), что заражение сеголетков окуня плероцеркоидами *T. nodulosus* существенно влияет на состояние печени

хозяина. Инвазия вызывает увеличение ее сырой массы на 42% и снижение содержания глюкозы и гликогена на 42 и 34% соответственно, что свидетельствует об интенсивном использовании углеводов в организме рыб в ответ на заражение.

Снижение активности протеиназ у зараженных плероцеркоидами окуней согласуется с данными о влиянии заражения на активность гидролаз в кишечнике сеголетков окуня (Izvekova, Tyutin, 2014). В частности, показано, что у зараженных плероцеркоидами *T. nodulosus* сеголетков активность протеолитических и гликолитических ферментов ниже, чем у незараженных, причем в переднем отделе кишечника активность пищеварительных гидролаз снижается особенно заметно.

У многих видов рыб, в том числе у окуня, вследствие тесного сращения поджелудочной железы с печенью, оба органа рассматриваются как гепатопанкреас, хотя их клетки независимы друг от друга. Клетки поджелудочной железы секретируют в кишечник протеолитические ферменты в неактивной форме (трипсиноген, химотрипсиноген, прокарбоксипептидазы А и В), а также амилазу, липазу и нуклеазы в активном состоянии (Сорвачев, 1982). Кроме того, важную роль в процессах переваривания пищи у рыб, как и у других животных, играет мембранное пищеварение, осуществляемое на структурах щеточной каймы энтероцитов с помощью адсорбированных из полости кишечника панкреатических и собственно мембранных ферментов (Уголев, Кузьмина, 1993). При этом гидролиз белков и полисахаридов осуществляется в основном в полости кишечника, а гидролиз дисахаридов – преимущественно на структурах его слизистой оболочки. Установлено, что сахараза прочно связана с мембраной щеточной каймы энтероцитов и до 97–100% ее активности определяется в слизистой оболочке кишечника рыб (Уголев, Кузьмина, 1993). Снижение активности гидролаз, как у сеголетков, так и у взрослых окуней, может быть связано с нарушениями в функционировании гепатопанкреаса у зараженных рыб и, как следствие, снижением синтеза и поступления зимогенов

протеолитических ферментов и амилазы в кишечник. Однако на активность собственно мембранного фермента сахаразы заражение плероцеркоидами не влияет.

С помощью ингибиторного анализа установлены различия в спектрах протеиназ у незараженных и зараженных рыб и преобладание у них активности сериновых протеиназ, представленных трипсином, химотрипсином и эластазой (Natalia et al., 2004). Данные ряда работ (Dimes et al., 1994; Eshel et al., 1993; Jónás et al., 1983; Kumar et al., 2007; Natalia et al., 2004) свидетельствуют о большой вариабельности доли сериновых протеиназ в общей протеолитической активности различных видов рыб. Снижение доли сериновых протеиназ, небольшое снижение активности амилаз (панкреатических ферментов) и отсутствие изменений в активности сахаразы у зараженных окуней подтверждает высказанное выше предположение о зависимости активности гидролитических ферментов кишечника от нарушения функционирования гепатопанкреаса. Влияние заражения взрослыми цестодами на изменение спектра протеиназ показано для некоторых видов рыб (Извекова, Соловьев, 2016).

Ингибирование общей протеолитической активности EDTA указывает на присутствие протеиназ, для действия которых необходимы ионы металлов. Сведения по активности металлопротеиназ для разных видов рыб различны и колеблются от следовых количеств до весьма значительных величин (Dimes et al., 1994; Munilla-Morán, Saborido-Rey, 1996).

Кроме того, у зараженных взрослых окуней, как и у ранее исследованных сеголетков (Izvekova, Tyutin, 2014), изменяется соотношение активности ферментов. Однако, у сеголетков в большинстве случаев коэффициент Г/П (отношение активности гликозидаз, включающих активность панкреатических амилаз и сахаразы, к активности протеиназ) снижается в 2 раза, что указывает на более значительное влияние заражения *T. nodulosus* на синтез гликозидаз по сравнению с протеиназами у этой возрастной группы. У взрослых зараженных окуней коэффициенты А/П и

С/П, напротив, значительно повышаются. По нашему мнению, это 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). В Рыбинском водохранилище окунь младших возрастных групп в основном питается различными беспозвоночными, а в возрасте 2+–4+ (в зависимости от места обитания) переходит на питание рыбой (Герасимов и др., 2015).

Большее влияние заражения плероцеркоидами на активность протеиназ по сравнению с активностью амилаз у взрослых окуней, по-видимому, связано с повышенной чувствительностью его протеолитических ферментов к действию различных факторов. Установлено (Извекова, Соловьев, 2012), что активность протеиназ у рыб при заражении цестодами изменяется значительно, чем активность гликозидаз. 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) по сравнению с гликозидазами.

3.4. 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 $0.49 \pm 0.03 \Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$. Во фракциях Д2 и Д3 фиксируется незначительная протеолитическая активность (0.003 ± 0.001 и $0.002 \pm 0.001 \Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$ соответственно). Показано, что PMSF существенно снижает активность протеиназ, смытых с тегумента цестод. Во фракции Д1 PMSF ингибирует $68.9 \pm 5.0\%$ активности (Рис. 9). 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 (Рис. 9).

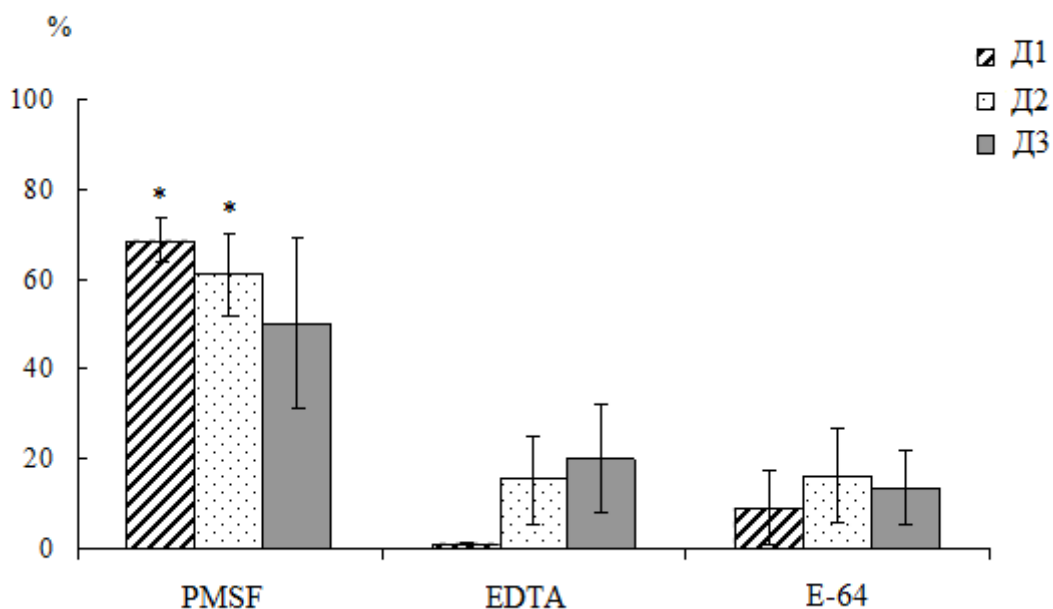


Рис. 9. Доля ингибирования протеолитической активности фракций, смытых с тегумента *T. nodulosus* различными ингибиторами, % (*достоверный ингибиторный эффект, $p < 0.05$). PMSF – ингибитор сериновых протеиназ, EDTA – ингибитор металлопротеиназ, E-64 – ингибитор цистеиновых (тиоловых) протеиназ.

Результаты исследования десорбции протеиназ с тегумента *T. nodulosus* согласуются с полученными ранее данными по характеристике десорбции гидролитических ферментов с тегумента цестод – основная активность представлена легко десорбируемой фракцией, характеризующей активность ферментов хозяина (Izvekova et al., 1997). Известно, что цестоды не только продуцируют собственные гидролазы, но захватывают и адсорбируют ферменты хозяина, в том числе и протеиназы (Halton, 1997; Izvekova et al., 1997; Кузьмина и др., 2000; Dalton et al., 2004; Извекова, 2006). Значительный разброс данных, отражающийся на величине стандартной ошибки, очевидно, связан с тем, что в щуках из природных популяций находятся черви разного размера и возраста, что, в свою очередь, сказывается на морфологических

особенностях их тегумента и его адсорбционной способности (Куперман, 1988). Ингибиторный анализ показал, что основную часть адсорбированных на тегументе ферментов составляют сериновые протеиназы. В кишечнике щуки также основная доля протеолитической активности связана с сериновыми протеиназами и по некоторым данным составляет 56.4 и 59.6% у не зараженных и зараженных *T. nodulosus* щук соответственно (Извекова, Соловьев, 2016). Очевидно, низкая активность протеиназ во фракциях Д2 и Д3 не позволила выявить достоверного влияния на нее ни одного из исследованных ингибиторов.

Заключение по главе

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

4.1. *Eubothrium rugosum*

4.1.1. Инактивация трипсина живыми червями *E. rugosum*

На протяжении всех опытов с трипсином черви *E. rugosum* оставались живыми и не подвергались протеолизу. Содержание червей (n=16) в растворе трипсина приводит к снижению его активности (Рис.10). Уровень влияния цестод на активность трипсина зависит от концентрации последнего (Рис. 11). 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 (Рис. 10). Снижение активности трипсина для всех временных интервалов достоверно ($p<0.05$). Через 24 ч инкубации ингибирование трипсина обеих концентраций достигает примерно 60% (Рис. 11).

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. Активность трипсина возрастает с увеличением его концентрации, а доля его ингибирования через 24 ч одинакова при инкубации живых червей в растворах разной концентрации. Следовательно, абсолютное количество ингибированного фермента, пропорциональное

количеству ингибитора, увеличивается с увеличением концентрации трипсина. Полученные данные согласуются со сведениями для *H. diminuta* из кишечника крысы (Pappas, Read, 1972 a, b). Показано, что при инкубации *H. diminuta* с трипсином, α - и β -химотрипсином *in vitro* указанные ферменты инактивировались на поверхности червя. Кроме того, инактивация прогрессировала со временем, даже если червей периодически переносили в свежий раствор фермента, и зависела от периода экспозиции червей в ферменте (Pappas, Read, 1972 a). 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.

4.1.2. Масса цестод и содержание белка в препаратах *E. rugosum*

В связи с тем, что природная локальная гемипопуляция *E. rugosum* в хозяине – налиме неоднородна была проведена серия опытов, в которых червей распределили по двум группам – "короткие" (n=8) и "длинные" (n=5). Масса группы "коротких" червей достоверно не отличалась от массы группы "длинных" (Таблица 7, $p>0.05$). В тоже время масса одного "короткого" червя существенно меньше массы "длинного" ($p=0.003$) и массы группы "коротких" ($p=0.001$), а масса одного "длинного" червя не отличается от массы группы "длинных". Содержание белка в среде инкубации примерно в 22 раза ниже, чем в экстракте для обеих групп червей. Однако нет достоверных различий в его содержании между группами "коротких" и "длинных" червей как в среде инкубации, так и в экстракте (Таблица 7).

Таблица 7. 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	0.755±0.103	17.283±0.539
"Длинные"	1.28±0.31	1.03±0.29	0.694±0.174	15.035±1.177

4.1.3. Ингибирующая способность среды инкубации цестод *E. rugosum*

Не обнаружено значительного ингибирующего эффекта на активность трипсина 50 и 100 мкл среды инкубации как "коротких", так и "длинных" червей (Рис. 12А). Небольшое снижение активности трипсина ($p < 0.1$) отмечено только при действии 100 мкл среды инкубации "длинных" червей на трипсин в обеих исследованных концентрациях.

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. Последнее подтверждается небольшим снижением активности трипсина ($p < 0.1$), отмеченным при действии 100 мкл среды инкубации "длинных" червей на трипсин в обеих исследованных концентрациях. Не удалось обнаружить секрецию активного ингибитора в окружающую среду и для *H. diminuta* (Pappas, Read, 1972 a).

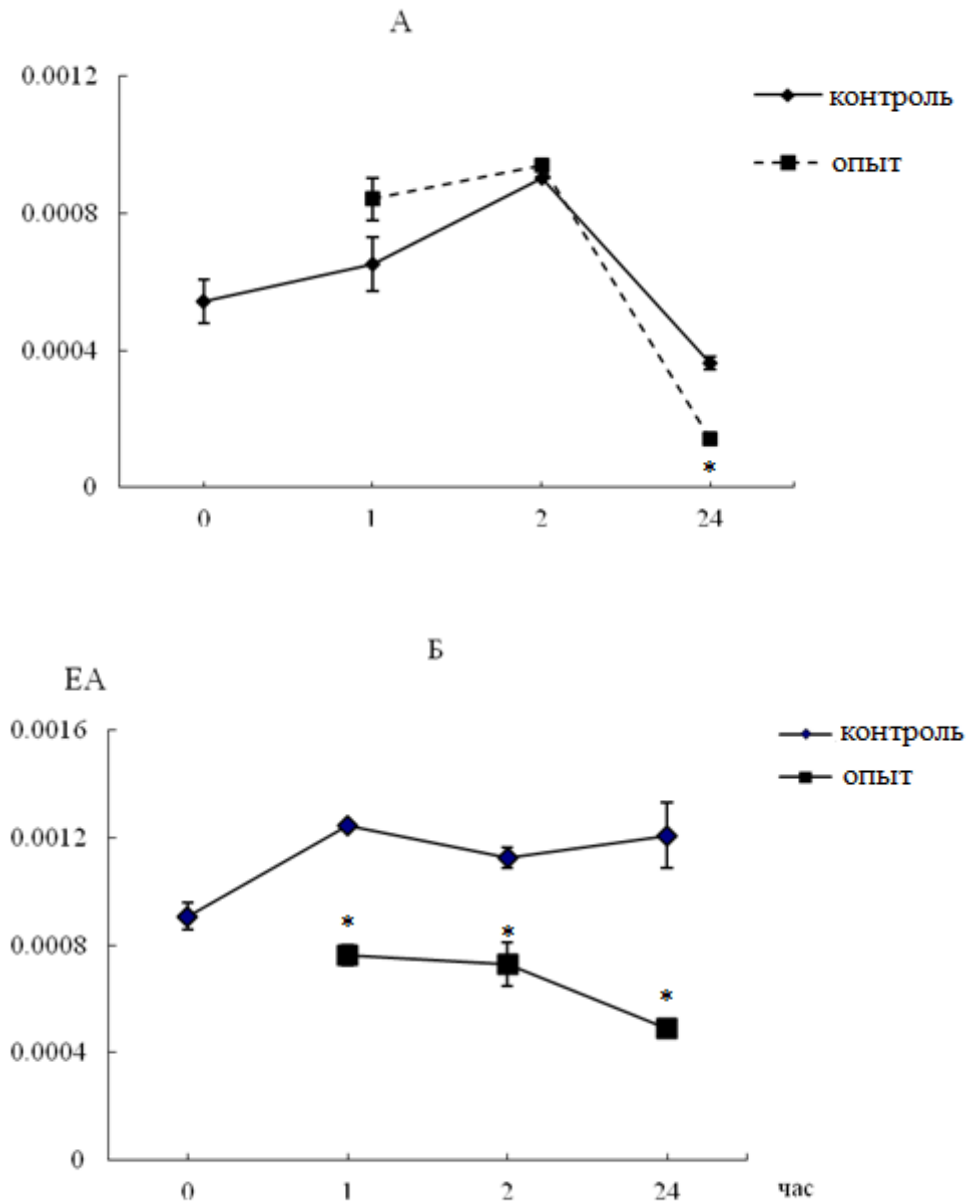


Рис. 10. Влияние живых цестод *E. rugosum* на активность трипсина в концентрации 0.005 мг/мл (А) и 0.01 мг/мл (Б), ΔE₄₄₀/(г × мин) (*достоверный ингибиторный эффект, $p < 0.05$).

Контроль – активность раствора трипсина, определенная через различные промежутки времени после приготовления;

опыт – активность раствора трипсина после содержания в нем червей при температуре 10°C в течение различных промежутков времени.

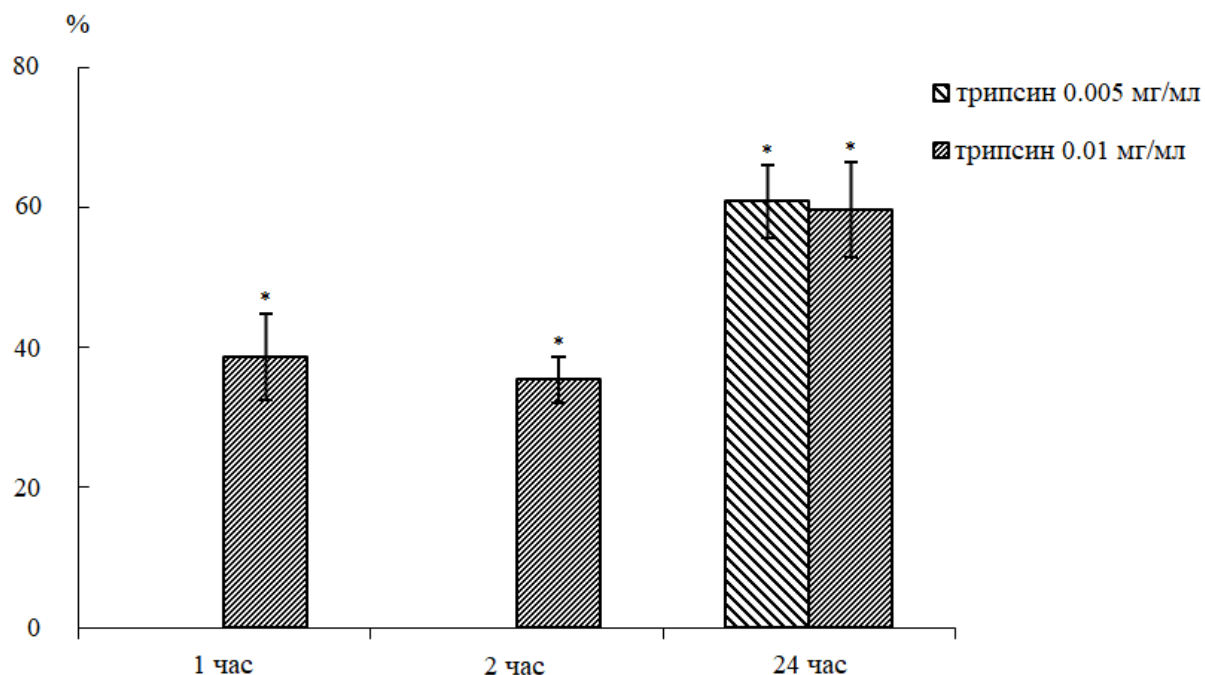


Рис. 11. Доля ингибирования активности трипсина живыми цестодами *E. rugosum* через различные промежутки времени, % (*достоверный ингибиторный эффект, $p < 0.05$).

4.1.4. Ингибирующая способность экстракта цестод *E. rugosum*

Ингибирующая способность экстрактов *E. rugosum* по отношению к трипсину исследована при различных вариантах опыта. Так, исследование влияния экстракта червей на активность трипсина в концентрации 0.005 и 0.01 мг/мл показало значительное ее снижение при действии как 50, так и 100 мкл экстракта цестод обеих групп, $p < 0.05$ (Рис. 12Б). В тоже время не обнаружено различий в действии экстракта червей на активность трипсина ни от концентрации фермента, ни от используемых объемов экстракта, ни от размера червей. Однако доли ингибирования трипсина экстрактом "коротких" червей различались при использовании растворов трипсина 0.005 и 0.01 мг/мл и были достоверно выше в растворе трипсина 0.01 мг/мл, $p < 0.05$ (Рис. 13).

Проверка активности трипсина в зависимости от его концентрации показала, что она увеличивается с увеличением его концентрации ($F=29.754$,

$p < 0.001$) (Рис. 14). При действии 50 мкл экстракта червей активность всех исследованных концентраций трипсина достоверно снижается. При этом уровень активности трипсина практически перестает быть зависимым от его концентрации (Рис. 14). Влияние экстракта червей разного размера на активность трипсина не различается ($p > 0.05$). Вычисление доли ингибирования трипсина различных концентраций экстрактом цестод показало, что при концентрации трипсина 0.0025 мг/мл доля его ингибирования составляет около 60%, а при увеличении концентрации до 0.05 мг/мл – возрастает примерно до 80% и при дальнейшем повышении концентрации трипсина уже значительно не изменяется (Рис. 15).

Обнаружение ингибирующей способности экстракта цестод 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. По немногочисленным данным других авторов более высокая ингибирующая способность отмечена в экстрактах плероцеркоидов *L. intestinalis*, чем в среде культивирования (Matskási, Juhász, 1977), что согласуется с полученными нами результатами.

Исследование влияния экстракта червей на активность трипсина различной концентрации также показывает, что продуцируемый цестодами ингибитор не обеспечивает 100% инактивацию трипсина. При действии экстракта червей активность всех исследованных концентраций трипсина снижается, при этом уровень активности фермента практически не зависит от его концентрации, но повышается доля ингибирования трипсина, т.е. увеличивается абсолютное количество ингибируемого фермента. Следовательно, ингибирующий эффект гомогената червей зависит от концентрации трипсина.

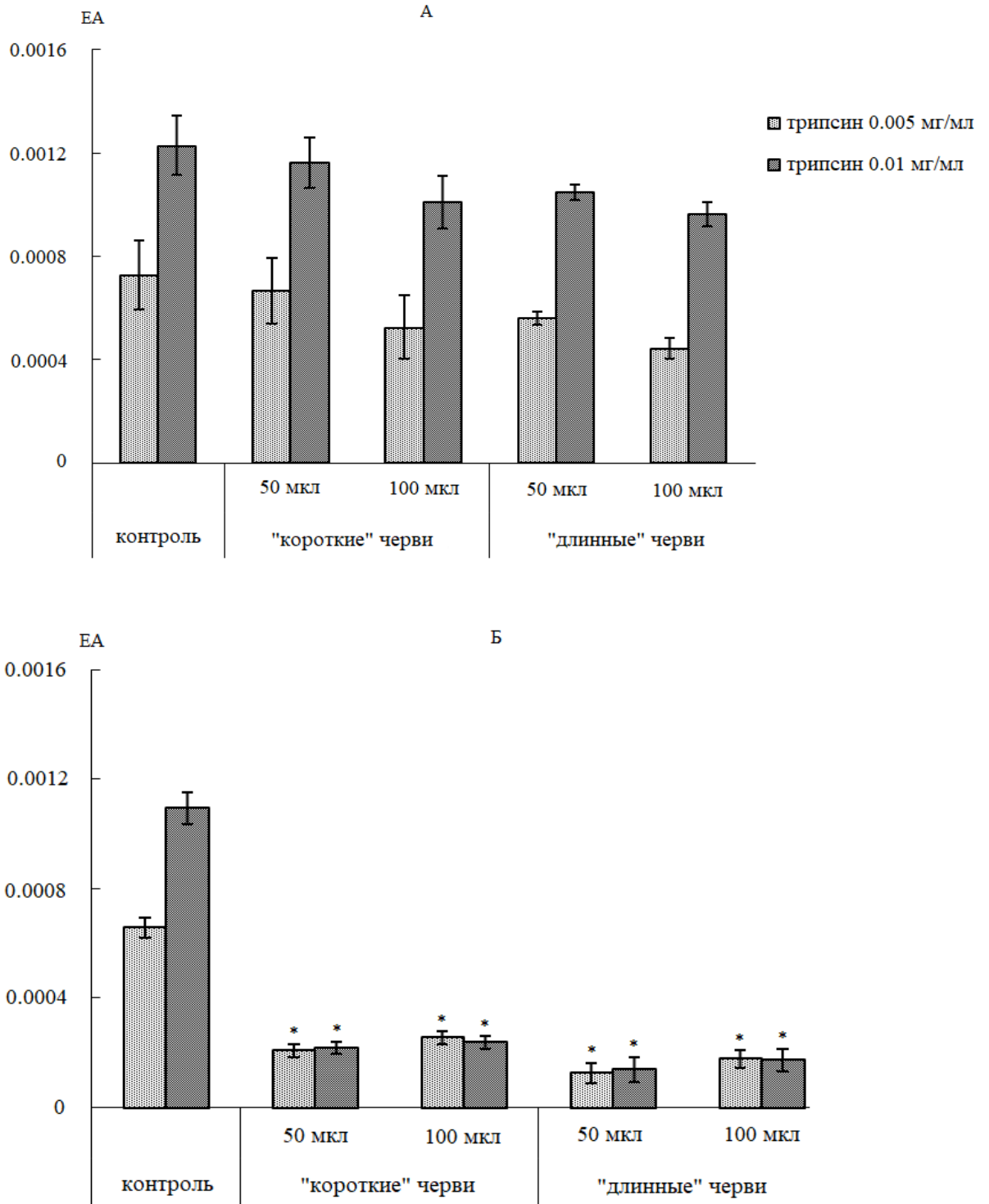


Рис. 12. Влияние различных объемов среды инкубации (А) и экстракта (Б) цестод *E. rigosum* на активность трипсина, $\Delta E_{440}/(\Gamma \times \text{мин})$ (*достоверный ингибиторный эффект, $p < 0.05$).

Контроль – активность раствора трипсина в концентрации 0.005 мг/мл или 0.01 мг/мл. "Короткие" черви и "длинные" черви – активность раствора трипсина в концентрации 0.005 мг/мл или 0.01 мг/мл при добавлении 50 и 100 мкл среды инкубации (А) или экстракта (Б) "коротких" и "длинных" червей.

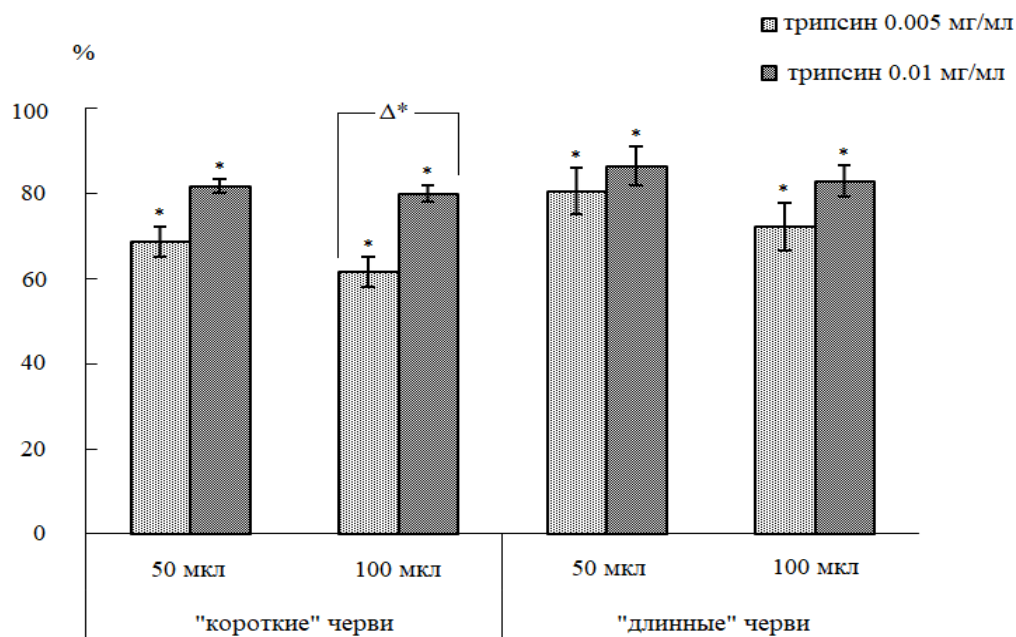


Рис. 13. Доля ингибирования трипсина различными объемами экстракта червей *E. rugosum*, % (*достоверный ингибиторный эффект; Δ* достоверные различия между двумя концентрациями трипсина, $p < 0.05$).

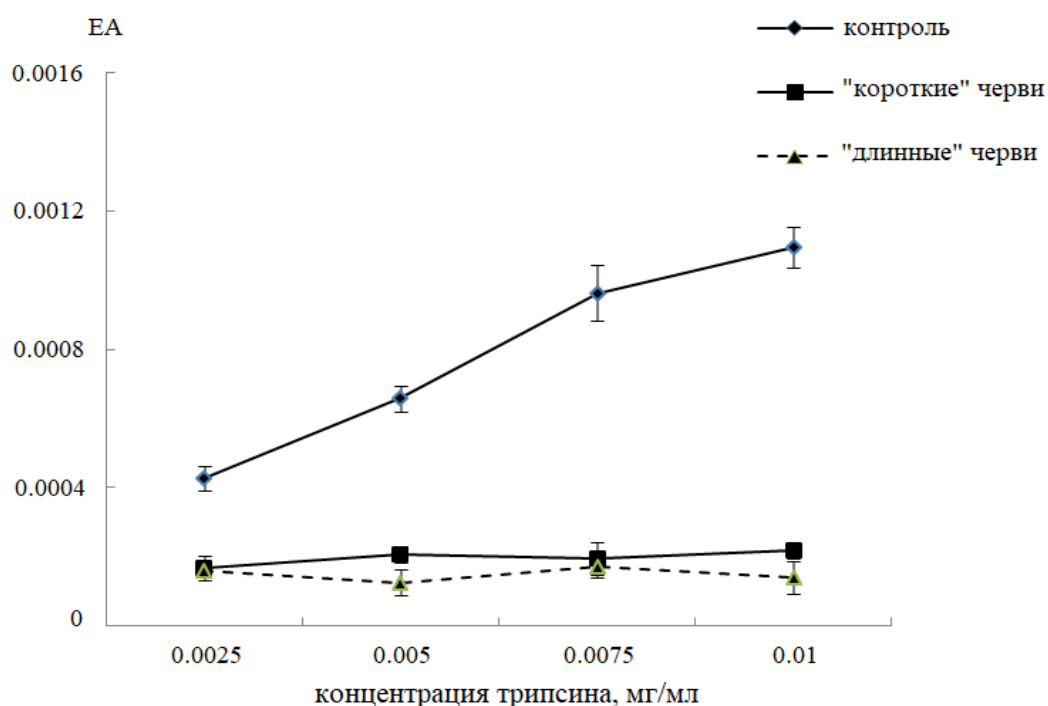


Рис. 14. Влияние 50 мкл экстракта червей на активность трипсина различной концентрации, $\Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$.

Контроль – активность раствора трипсина различных концентраций.

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

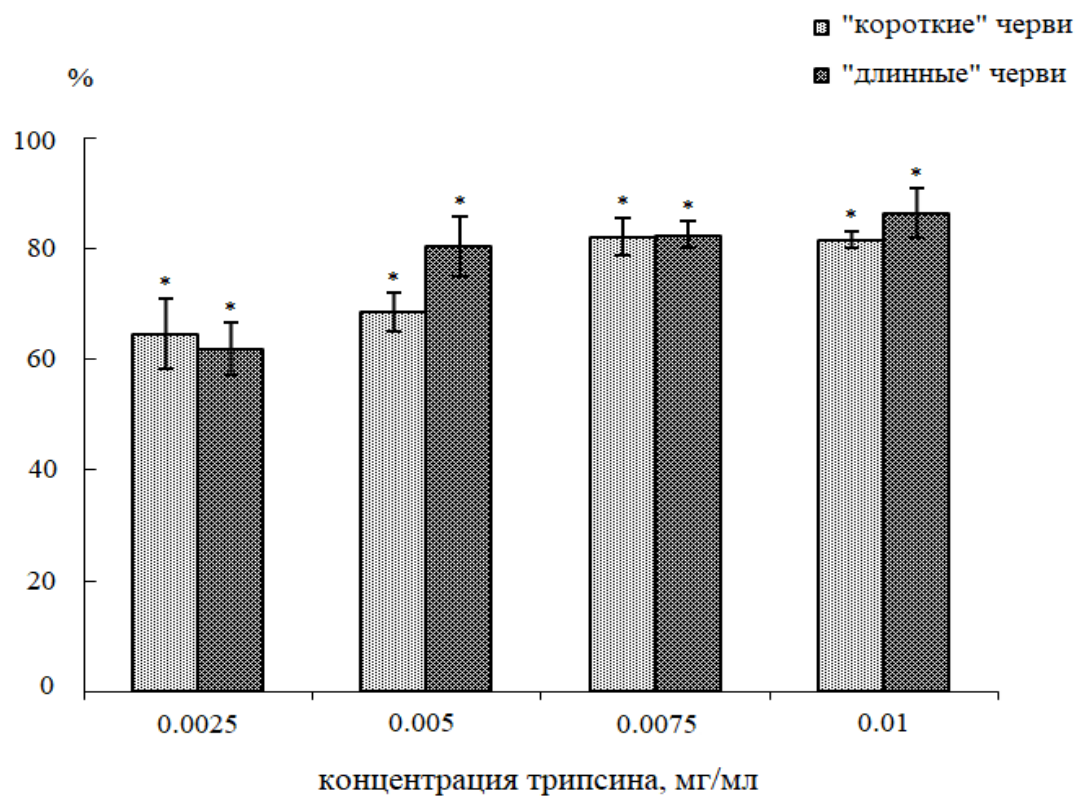


Рис. 15. Доля ингибирования трипсина различных концентраций экстрактом цестод, % (*достоверный ингибиторный эффект, $p < 0.05$).

Обозначения как на Рис. 12.

4.1.5. Влияние экстракта червей *E. rugosum* на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника налима

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. 16). Эта активность также ингибируется PMSF – синтетическим ингибитором сериновых протеиназ. Полученные эффекты достоверны ($F=14.8$, $p=0.00002$). 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.

Полученные данные об ингибирующем действии экстракта цестод на активность протеиназ хозяев согласуются с имеющимися в литературе сведениями. Так, ранее обнаружено ингибирование протеолитической активности экстрактами плероцеркоидов *L. intestinalis* из полости тела леща и взрослых червей из кишечника утки (Matskási, Juhász, 1977). Позже было установлено, что экстракты, приготовленные из личинок и взрослых червей *B. acheilognathi*, угнетали трипсиновую и химотрипсиновую активность кишечника карпа *in vitro* (Matskási, 1984). При этом известно, что большинство охарактеризованных белковых ингибиторов гельминтов относятся к группе ингибиторов сериновых протеиназ (Molehin et al., 2012).

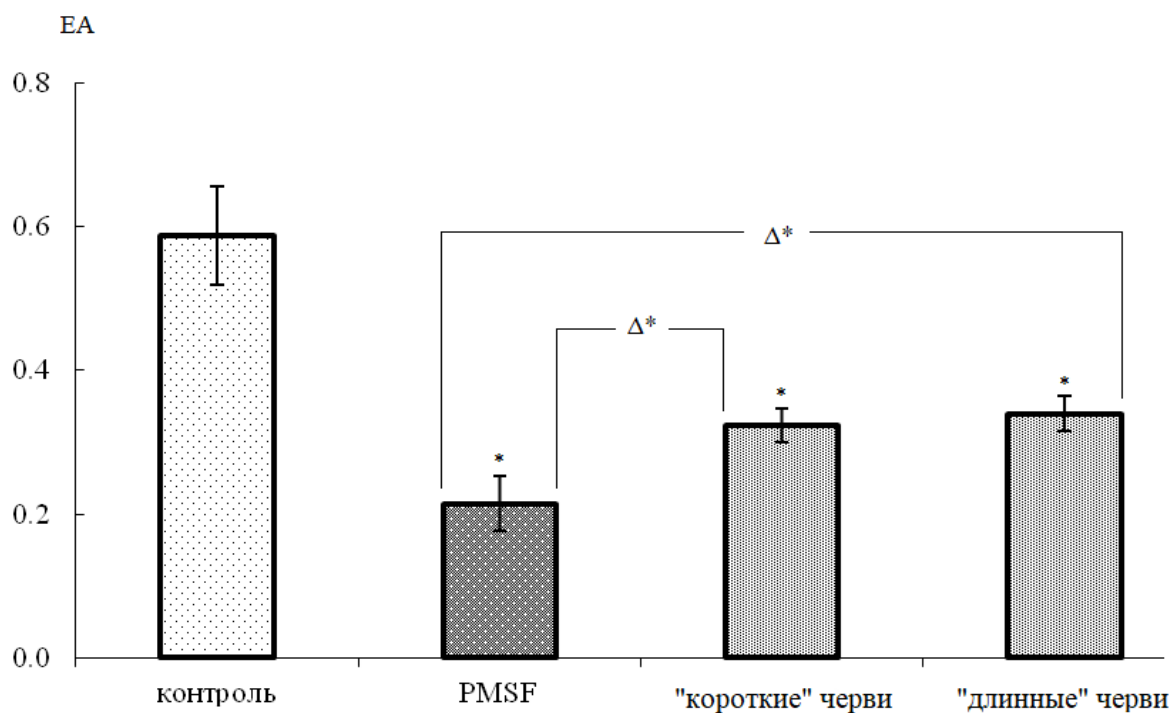


Рис. 16. Влияние 50 мкл экстракта червей *E. rugosum* на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника налима, $\Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$ (*достоверный ингибиторный эффект; Δ^* достоверные различия между ингибиторной активностью экстрактов червей и PMSF, $p < 0.05$).

Контроль – протеолитическая активность гомогената слизистой оболочки кишечника налима. PMSF – активность гомогената слизистой оболочки кишечника налима при добавлении 50 мкл ингибитора сериновых протеиназ PMSF. Следующие два столбика – активность гомогената слизистой оболочки кишечника налима при добавлении 50 мкл экстракта "коротких" и "длинных" червей.

Протеолитическая активность слизистой оболочки кишечника налима ингибируется экстрактом цестод в меньшей степени, чем коммерческий препарат трипсина (до 51% для первой и до 88% для второго). Это связано с тем, что протеолитическая активность слизистой оболочки представлена не только активностью трипсина, но также и активностью химотрипсина и дипептидаз (Eshel et al., 1993; Natalia et al., 2004). В тоже время PMSF – специфический ингибитор сериновых протеиназ ингибирует $64.3 \pm 3.8\%$ протеолитической активности слизистой. Известно, что доля сериновых протеиназ преобладает в общей протеолитической активности различных видов рыб, однако этот показатель сильно варьирует (Eshel et al., 1993;

Natalia et al., 2004; Kumar et al., 2007). В тоже время некоторыми авторами высказано предположение, что продуцируемый *H. diminuta* ингибитор имеет высокое сродство и возможно большую специфичность к протеиназам тонкого кишечника хозяина – крысы, по сравнению с бычьим трипсином (Pappas, Uglem, 1990). Однако полученные нами данные в этой серии опытов свидетельствуют об обратном – ингибирующее действие *E. rugosum* более специфично к трипсину, чем к протеиназам кишечника налима. Возможно, это связано с различным филогенетическим положением, а также видовой специфичностью и типом питания, а соответственно и уровнями ферментативной активности в кишечниках хозяев *E. rugosum* и *H. diminuta* – налима и крысы соответственно. По мнению некоторых авторов, инактивированный фермент может изменять "микроокружение" червя в тонком кишечнике хозяина, а относительно большие количества фермента, присутствующие в норме в тонком кишечнике хозяина, маскируют инактивированный фермент (Pappas, 1980). Кроме того, вероятно, оставшийся в кишечнике активным после ингибирующего действия червей трипсин совместно с химотрипсином и дипептидазами обеспечивает общую протеолитическую активность в кишечнике хозяина, необходимую для осуществления жизнедеятельности как хозяина, так и паразита.

Рабочей гипотезой при разделении червей 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. Зависимость инактивации трипсина и химитрипсина от массы червя показана и для *H. diminuta* (Pappas, Read, 1972 a, b). Авторы связывают это со сменой гликокаликса, происходящей у *H. diminuta* за 6 ч (Oaks,

Lumsden, 1971). 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; Кнох, 2007). Присутствие белка в среде инкубации объясняется естественной сменой гликокаликса (Oaks, Lumsden, 1971).

4.1.6. 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 $\Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$. PMSF снижает активность протеиназ слизистой оболочки кишечника налима до 0.214 ± 0.038 $\Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$, 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% (критерий Манна–Уитни; $p < 0.05$).

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. 17). 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 то же 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. 17).

Вычисление доли ингибирования активности протеиназ слизистой оболочки кишечника изученных видов рыб позволило установить, что только у синца и судака эта активность ингибируется экстрактом *E. rugosum* и PMSF в одинаковой степени. Для всех остальных исследованных рыб PMSF ингибирует протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника достоверно сильнее, чем экстракт *E. rugosum*, $p < 0.05$ (Рис. 18). При этом доля ингибирования активности PMSF для разных видов рыб колеблется от 41.8% (щука) до 75.2% (окунь), в то время как экстракт *E. rugosum* ингибирует эту активность в пределах от 4.6% (щука) до 56.2% (синец). Самая низкая доля ингибирования экстрактом червя отмечена для слизистой оболочки кишечника форели и щуки, а самая высокая – для леща и синца (Рис. 18).

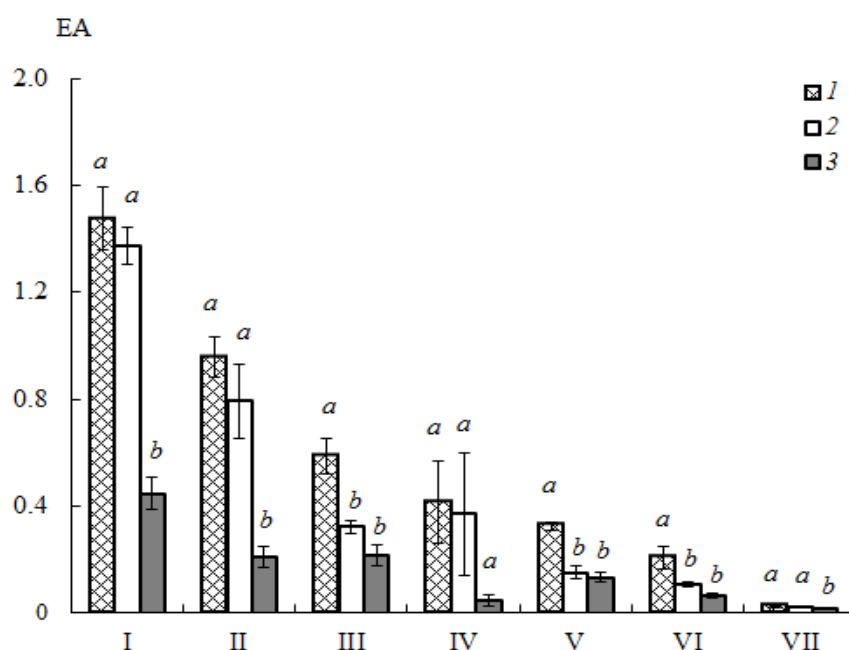


Рис. 17. Протеолитическая активность слизистой оболочки кишечника различных видов рыб (1) и влияние на нее экстракта червей *E. rugosum* (2) и PMSF (3), $\Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$.

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.

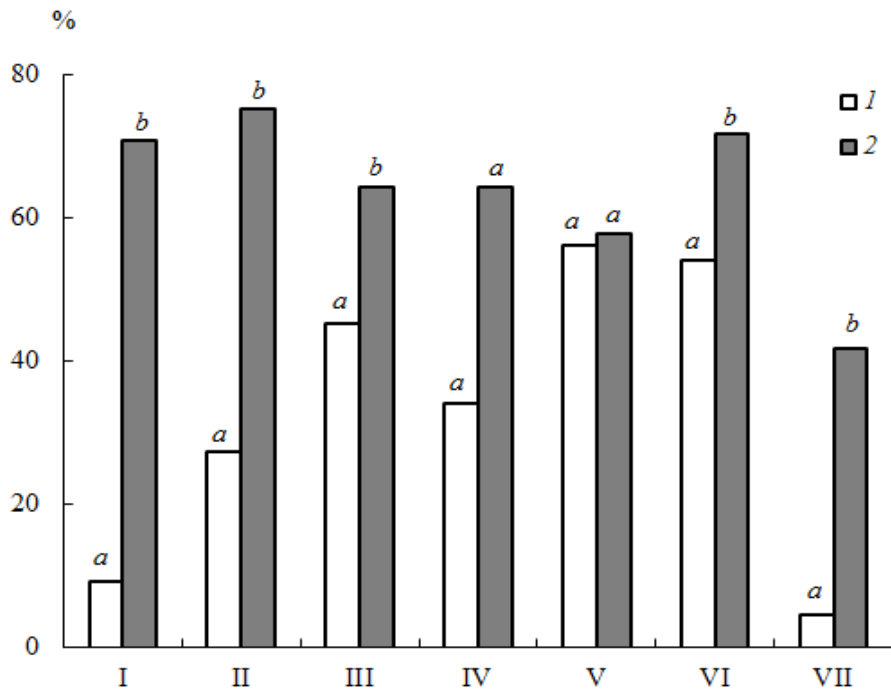


Рис. 18. Доля ингибирования протеолитической активности слизистой оболочки кишечника различных видов рыб экстрактом червей *E. rugosum* (1) и PMSF (2), %.

Обозначения как на рис. 17.

Однофакторный дисперсионный анализ показал, что вид рыбы как фактор оказывал достоверный эффект на величину процентного ингибирования как зависимую переменную и в случае экстракта гельминта ($F=103.90$, $p<0.0001$), и в случае PMSF, но в гораздо меньшей степени ($F=9.55$, $p<0.001$). Серия множественных попарных сравнений продемонстрировала, что эффективность действия ингибитора, продуцируемого цестодой, на протеолитические ферменты кишечника хозяина не проявляет достоверных отличий от соответствующих значений для аналогичных ферментов леща, синца и судака ($p>0.05$). В то же время протеиназы слизистой оболочки кишечника налима оказались более чувствительными к воздействию экстракта червя, по сравнению с протеиназами кишечника других хищников (форели, щуки и окуня) ($p<0.05$).

Как показывает индекс Джини, видовая селективность эффекта ингибирования при использовании экстракта червя более выражена, чем при использовании раствора PMSF (Рис. 19). Так, при воздействии ингибитора,

продуцируемого червем, кумулятивные кривые отстоят значительно дальше от диагональной линии графика, указывая на более неравномерное распределение данных по разным видам рыб, чем при использовании PMSF. Соответственно, индекс Джини достигает 32.4% в случае применения экстракта червя и не превышает 8.6% в случае воздействия PMSF (при использовании полного набора данных от семи видов рыб). Сходные результаты были получены и при анализе аналогичных данных отдельно для хищных видов рыб (соответственно 35.2 и 9.3%).

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).

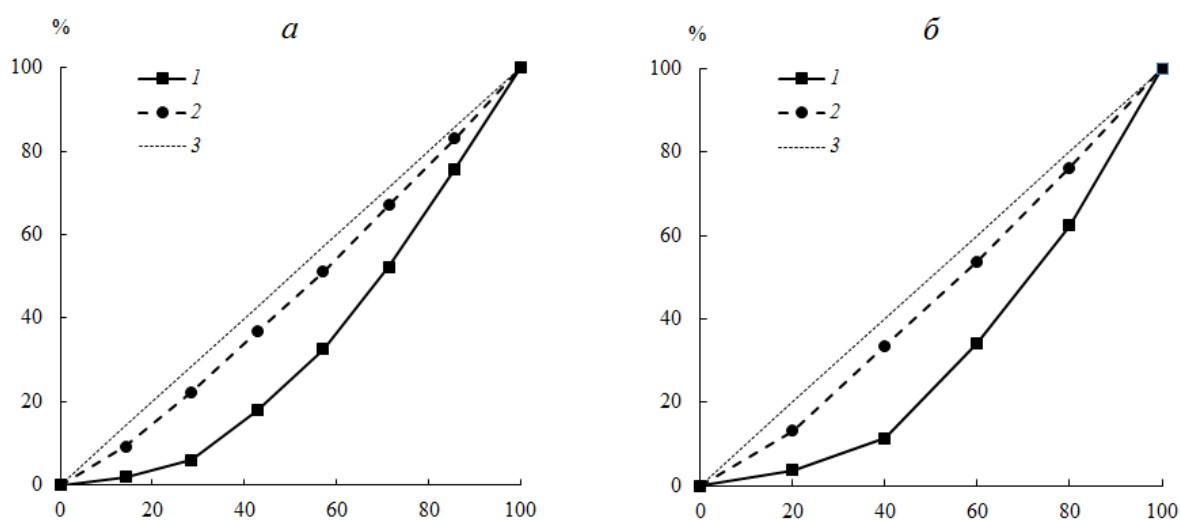


Рис. 19. Оценка селективности ингибирующего действия экстракта *E. rugosum* (1) и PMSF (2) при использовании полного набора данных по семи видам рыб (а) и для подгруппы из пяти хищных видов (б) (3 – отсутствие ингибирования).

По оси ординат – кумулятивная доля суммарного ингибирования (%), по оси абсцисс – кумулятивная доля числа тестируемых видов (%).

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.

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 слизистой оболочки кишечника не только налима, но также двух других видов рыб (синца 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. Статистически, значения процентного ингибирования для протеиназ кишечника налима были не ниже, чем для аналогичных ферментов остальных рыб, и в то же время достоверно выше, чем для большинства таковых у хищных видов. В пользу частичной селективности ингибитора, вырабатываемого *E. rugosum*, свидетельствует и индекс Джини, значения которого также указывают на неравномерное распределение уровней процентного ингибирования для исследуемого набора видов. Значения индекса Джини были невысокими (32.4–35.2% в зависимости от варианта расчета). В то же время, они вполне сопоставимы со значениями, полученными при исследовании некоторых других ингибиторов.

Например, коэффициенты Джини, вычисленные для 40 ингибиторов киназ, каждый из которых воздействовал на 85 различных киназ, изменялись в широких пределах от 9.3% для неселективного ингибитора до 90.5% для высокоселективного, составляя 56.8% для ингибитора с умеренной селективностью (Graczyk, 2007). Следует отметить, что экстракт гельминта отличался более выраженной селективностью воздействия в сравнении с PMSF. В случае полного набора данных (включавшего семь протестированных видов рыб), индекс Джини, скорее, характеризует общую неравномерность процентного ингибирования (т.е. селективность воздействия), чем специфичность как таковую, поскольку формально вид-хозяин не находится на вершине кумулятивной кривой. В то же время в выборке хищных видов рыб налим демонстрирует наивысшие показатели ингибирования, и в этой ситуации индекс Джини в равной мере отражает как селективность ингибитора, так и его специфичность к протеиназам конкретного хозяина. Дополнительным аргументом в пользу специфичности действия экстракта червя может служить тот факт, что среднее значение процентного ингибирования для протеиназ слизистой оболочки кишечника налима заметно превышает соответствующий средний уровень, вычисленный для аналогичных ферментов всех остальных видов рыб.

Имеются и другие сведения о специфичности действия ингибиторов цестод по отношению к различным протеиназам. Например, было выдвинуто предположение о специфичности взаимодействия *H. diminuta*, паразитирующей в кишечнике крыс, с трипсином, поскольку другие протеолитические ферменты (субтилизин, пепсин и папаин) не инактивируются этой цестодой (Schroeder et al., 1981). Избирательная специфичность ингибирования протеиназ показана для половозрелых цестод *T. pisiformis* из кишечника собак (Németh et al., 1979). Экстракты этих червей проявляли ингибирующую способность по отношению к трипсину и химотрипсину быка, собаки и кролика, однако этот ингибитор не влиял на гидролитическую активность субтилизина, эластазы, коллагеназы, пепсина,

ренина и папаина. Было также показано, что внутриклеточный серпин, вырабатываемый цестодой *E. multilocularis* ингибирует трипсин и трипсиноподобный плазмин, а также панкреатическую эластазу свиньи и эластазу нейтрофилов человека, что, по мнению авторов, может способствовать блокировке протеолитических ферментов в кишечнике хозяина (Merckelbach, Ruppel, 2007).

4.1.7. Сравнение ингибирующей способности экстракта *E. rugosum* и PMSF

Использование PMSF – ингибитора сериновых протеиназ – позволило установить преобладание активности этих протеиназ, представленных трипсином, химотрипсином и эластазой (Natalia et al., 2004), у всех изученных видов рыб. По всей вероятности, различия в уровнях активности сериновых протеиназ у исследованных видов рыб связаны с различиями в местах обитания, сроках отлова рыб и их типов питания (Уголев, Кузьмина, 1993). Имеющиеся в литературе данные также указывают на большую вариабельность доли сериновых протеиназ в общей протеолитической активности различных видов рыб. Преобладание активности сериновых протеиназ в общей протеолитической активности показано для рыб с различным типом питания – растительноядных, всеядных и хищных (Solovyev et al., 2014). Так, для хищника араваны *Scleropages formosus* установлено 77.1% ингибирование сериновых протеиназ ингибитором PMSF (Natalia et al., 2004). В пилорических придатках некоторых лососевых рыб ингибируется 44.09–70.27% сериновых протеиназ (Dimes et al., 1994). В кишечнике трех видов карповых *Catla catla*, *Labeo rohita* и *Hypophthalmichthys molitrix* PMSF ингибирует 59.1–79.6% активности (Kumar et al., 2007), в кишечнике обыкновенного робало *Centropomus undecimalis* активность протеиназ снижается на 60% (Concha-Frias et al., 2016), а толстогубой кефали *Chelon labrosus* – на 87% (Pujante et al., 2017). Значительно меньшее ингибирование протеиназ этим ингибитором показано

для хищных рыб дорады *Sparus aurata*, окуня-клювача *Sebastes mentella* (43.7 и 46.3% соответственно) и совсем незначительное 11.5% – для тюрбо *Scophthalmus maximus* (Munilla-Morán, Saborido-Rey, 1996). Небольшое ингибирование (26%) PMSF установлено в кишечнике всеядной пресноводной рыбы брикон *Brycon orbignyana* (García-Carreño et al., 2002). Различные уровни ингибирования сериновых протеиназ даже у рыб с одинаковым типом питания могут быть связаны с видовыми и физиологическими особенностями исследованных рыб (Уголев, Кузьмина, 1993), с возможными видоспецифичными особенностями структуры сериновых протеиназ, а также с различными методами, используемыми разными авторами при определении активности этих ферментов.

Снижение протеолитической активности слизистой оболочки кишечника налима при добавлении экстракта *E. rugosum* свидетельствует о присутствии в нем ингибитора протеиназ. Известно, что ингибиторы протеиназ секретируются в окружающую среду в незначительных количествах (Martzen et al., 1985). Поскольку объем реакционной смеси при определении протеолитической активности составляет 1.5 мл, а для определения ингибирования добавляется 50 мкл разведенного в 10 раз экстракта червей, т. е. от начальной массы червя разведение составляет 300 раз, можно предположить, что *E. rugosum* продуцирует небольшие количества высокоэффективного ингибитора протеиназ. Поскольку снижение протеолитической активности слизистой оболочки кишечника при использовании в качестве ингибитора экстракта *E. rugosum* сопоставимо с таковым при применении синтетического ингибитора сериновых протеиназ – PMSF, можно предположить, что выделяемый цестодой ингибитор инактивирует основные сериновые протеиназы кишечника – трипсин и химотрипсин. Несмотря на то, что доля ингибирования протеиназ при использовании экстракта *E. rugosum* значительно ниже, чем при применении PMSF, в кишечнике цестода устойчива к действию протеолитических ферментов. Очевидно, продуцируемого количества ингибитора достаточно,

чтобы обеспечить паразиту эту устойчивость. По мнению некоторых авторов, взаимодействие протеиназ хозяев и ингибиторов, продуцируемых цестодами, происходит непосредственно на адсорбционной поверхности последних, что приводит к необратимой инактивации фермента (Pappas, Read, 1972a; Schroeder et al., 1981).

4.2. *Triaenophorus nodulosus*

Для обнаружения ингибирующей способности цестод *T. nodulosus* по отношению к протеиназам использовали различные объемы среды инкубации (n=7) и экстрактов червей (n=8), а также различные концентрации трипсина. Обнаружено, что различные объемы, как среды инкубации, так и экстракта цестод достоверно снижают протеолитическую активность трипсина в концентрации 0.01 мг/мл (Рис. 20). Уровень влияния ингибиторов, продуцируемых червем, сравним с действием синтетического ингибитора PMSF. Кроме того, установленные эффекты не зависели от объема исследуемого препарата (Рис. 20).

Доля ингибирования протеолитической активности в гомогенате слизистой оболочки кишечника щуки и активности коммерческого препарата трипсина средой инкубации и экстрактом червей представлена на Рис. 21. Уровень снижения активности и его достоверность зависят от источника протеолитических ферментов (гомогената, различных концентраций трипсина) и исследуемого препарата (среда инкубации червей или их экстракт) (Рис. 21).

Сравнение доли ингибирования трипсина и гомогената слизистой кишечника щуки свидетельствует, что как среда инкубации червя, так и его экстракт сильнее ингибируют активность трипсина, чем гомогената слизистой. Доля ингибирования трипсина в зависимости от его концентрации, а также объема и используемого источника ингибитора колеблется от $23.9 \pm 6.1\%$ до $97.7 \pm 1.9\%$. Протеолитическая активность гомогената слизистой кишечника щуки ингибируется на 14.4 ± 2.8 – $33.0 \pm 4.6\%$,

при этом эффекты ингибирования достоверны не для всех исследованных вариантов (Рис. 21).

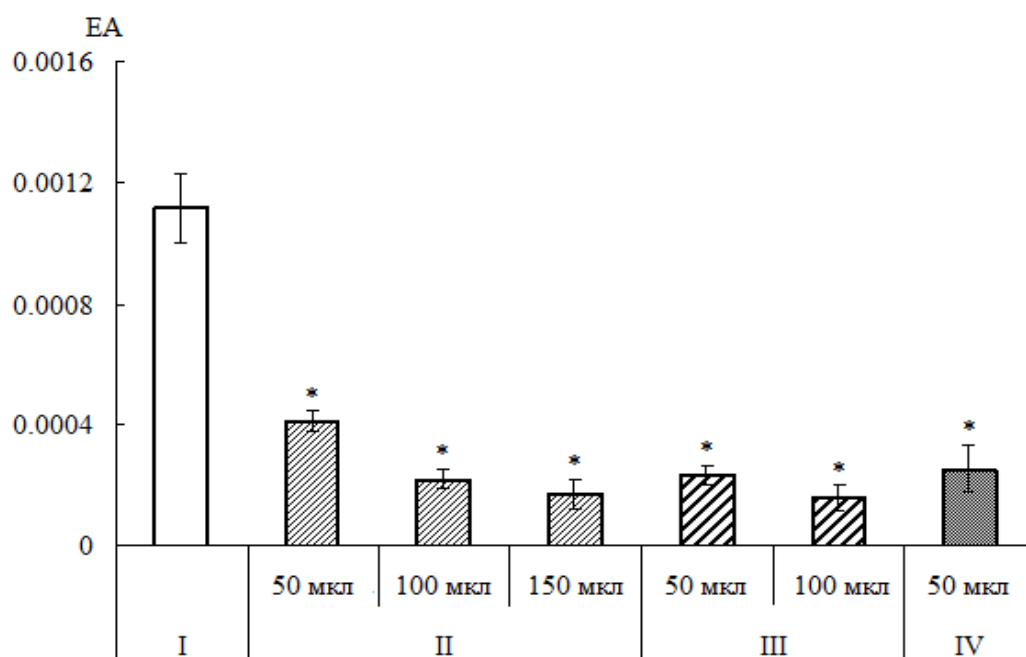


Рис. 20. Влияние различных источников ингибиторов на активность трипсина в концентрации 0.01 мг/мл, $\Delta E_{440}/(\Gamma \times \text{мин})$ (*достоверный ингибиторный эффект, $p < 0.05$).

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

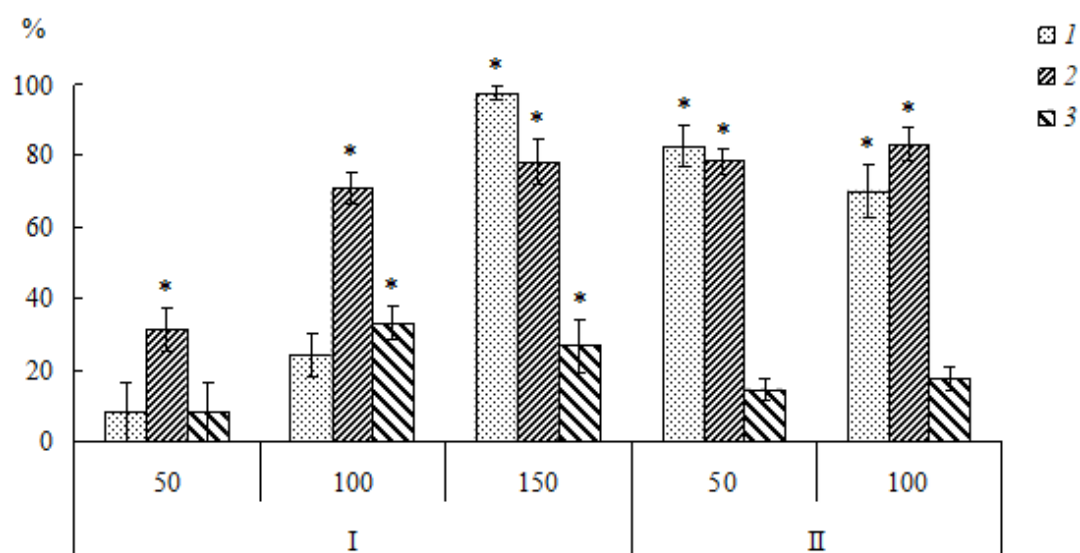


Рис. 21. Доля ингибирования протеиназ различными объемами (мкл) среды инкубации (I) и экстракта (II) *T. nodulosus*, % (*достоверный ингибиторный эффект, $p < 0.05$).

1 – трипсин 0.005 мг/мл; 2 – трипсин 0.01 мг/мл; 3 – гомогенат слизистой оболочки

Исследовано влияние экстракта *T. nodulosus* на активность коммерческого препарата трипсина. При добавлении 50 мкл экстракта червей к растворам трипсина различной концентрации показано, что степень ингибирования трипсина зависит от его концентрации. Высокая степень ингибирования определена для концентраций трипсина 0.005–0.01 мг/мл. Установленные эффекты достоверны, $p < 0.05$ (Рис. 22). При концентрации 0.0025 мг/мл активность трипсина снижалась недостоверно, а при концентрации трипсина 1 мг/мл ингибирования активности фермента экстрактом червей не обнаружено (Рис. 22). Следует отметить, что активность трипсина при увеличении его концентрации от 0.005 до 0.01 мг/мл увеличивается, но изменения эти недостоверны ($p = 0.414$). Доля ингибирования 50 мкл экстракта при концентрации трипсина 0.005–0.01 мг/мл практически не различается и составляет около 80% (78.6 ± 3.0 – $83.8 \pm 7.2\%$).

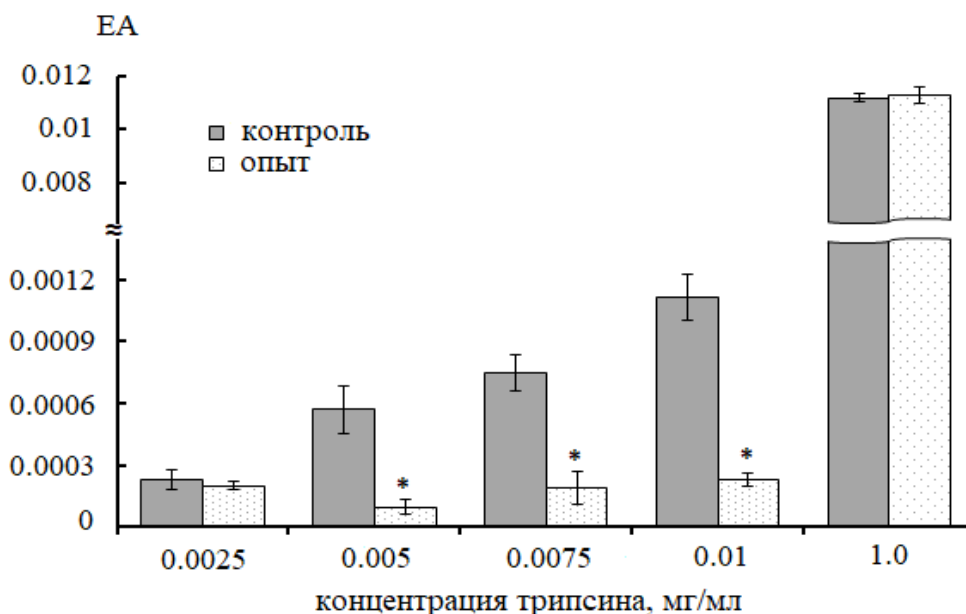


Рис. 22. Влияние 50 мкл экстракта *T. nodulosus* на активность трипсина разных концентраций, $\Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$ (*достоверный ингибиторный эффект, $p < 0.05$).

Контроль – активность трипсина в разных концентрациях;

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

Установлено, что после 24 ч инкубации червей значение рН в растворе Рингера снижается с 7.5 до 6.4 ± 0.1 . В это же время в инкубационной среде появляется белок и его содержание составляет 0.57 ± 0.16 мг/мл. В экстракте исследованных цестод содержание белка составило 18.19 ± 1.99 мг/мл.

Полученные данные показали, что цестоды *T. nodulosus* продуцируют вещества, подавляющие активность как протеиназ, присутствующих в гомогенате слизистой оболочки кишечника хозяина – щуки, так и активность растворов коммерческого препарата трипсина различной концентрации. По мнению некоторых авторов, инактивация фермента – показатель продуцирования и секреции ингибитора, не требующий доказательства его фактического присутствия (Matskási, Juhász, 1977). 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). Установленное большее ингибирующее влияние *T. nodulosus* на активность трипсина по сравнению с протеолитической активностью гомогената слизистой оболочки кишечника щуки связано, по-видимому, с тем, что активность протеиназ в кишечнике обеспечивается не только трипсином, но и химотрипсином, а также различными пептидазами (Соловьев и др., 2015). Возможно, продуцируемый *T. nodulosus* ингибитор специфичен для трипсина. Исследование ингибирующей способности *H. diminuta* также показало не полное ингибирование червями протеолитической активности хозяина и большую вариабельность полученных данных (Pappas, Uglem, 1990).

Обнаружение эффекта ингибирования протеиназ как средой инкубации червя, так и его экстрактом означает, что паразит непрерывно выделяет ингибитор в среду. Однако продуцируется небольшое его количество, поскольку увеличение объема среды инкубации и экстракта не приводит к существенному изменению уровня инактивации протеиназ. Нами

установлено, что после 24 ч в среде инкубации *T. nodulosus* обнаруживается белок. Это может быть связано как с происходящим регулярно обновлением гликокаликса (Oaks, Lumsden, 1971), так и с выделением в среду ингибитора протеиназ. При этом известно, что ингибиторы протеиназ у многих паразитических червей имеют белковую природу (Кнох, 2007).

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. Снижение ингибиторной активности при увеличении концентрации фермента также отмечено у цестоды *H. diminuta* (Pappas, Read, 1972 a; Pappas, 1978).

Условия проведения экспериментов (содержание червей в растворе Рингера для получения среды инкубации и последующее приготовление экстракта этих червей) позволяет высказать предположение, что выделение ингибиторов протеиназ не индуцируется присутствием протеиназ в среде, а их синтез осуществляется паразитом постоянно. Аналогичное предположение было сделано ранее при исследовании растворимой фракции изолированной щеточной каймы тегумента *H. diminuta* (Pappas, Uglem, 1990). Авторы показали, что эта фракция содержит вещества, ингибирующие протеолитическую и амидазную активность бычьего трипсина и некоторые протеолитические ферменты тонкого кишечника хозяина (Pappas, Uglem, 1990).

4.3. *Proteocephalus torulosus*

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. 23).

Сравнение ингибиторной активности экстракта *P. torulosus* с аналогичной активностью синтетического ингибитора PMSF показывает, что больший ингибиторный эффект как на активность протеиназ слизистой оболочки кишечника синца, так и на активность трипсина оказывает PMSF, понижая ее в 3 и 16 раз соответственно. Однако следует отметить, что экстракт червя в большей степени ингибирует активность протеиназ слизистой оболочки кишечника хозяина, чем активность трипсина. Доли ингибирования протеолитической активности трипсина и слизистой оболочки составляют 32% и 51% соответственно (Рис. 24). Тогда как PMSF сильнее ингибирует активность трипсина, чем слизистой оболочки кишечника. Доли ингибирования при этом составляют 94% и 69% соответственно ($p < 0.05$).

В литературе имеется ряд сообщений об инактивации протеиназ экстрактами цестод – паразитов рыб и секрети ингибиторов последними. Опыты *in vitro* проводились на *L. intestinalis* (L.) (Matskasi, 1980) и *B. acheilognathi* (Matskasi, 1984). С *P. torulosus* подобные опыты ранее не проводились. Нами установлено, что экстракт *P. torulosus* ингибировал активность протеиназ слизистой кишечника хозяина – синца и коммерческий препарат трипсина в опытах *in vitro*. Это подтверждает высказанное выше предположение о том, что паразитические плоские черви в кишечнике хозяина также снижают активность протеолитических ферментов благодаря продуцированию и секреции специфических ингибиторов. При этом более эффективное ингибирование экстрактом *P. torulosus* протеолитической активности слизистой оболочки кишечника синца по сравнению с коммерческим препаратом трипсина связано, по всей видимости, во-первых, с более высоким сродством ингибитора червя с ферментами кишечника хозяина, и, во-вторых, с тем, что цестодой, очевидно, секретируется и выделяется более чем один ингибитор. При этом известно, что протеолитическая активность слизистой оболочки кишечника определяется

не только активностью трипсина, но и химотрипсина и различных дипептидаз (Кузьмина, 1994).

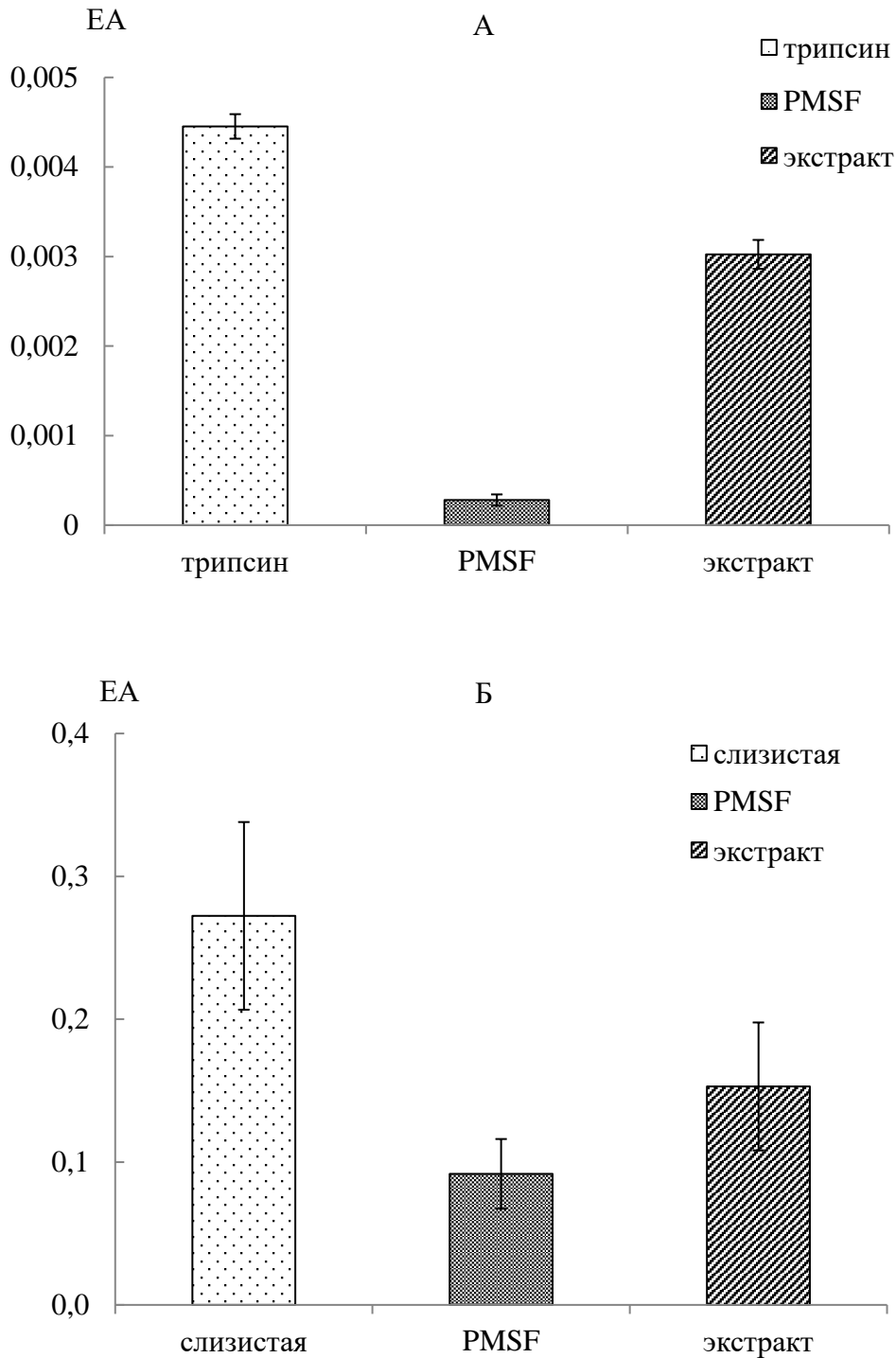


Рис. 23. Влияние PMSF и экстракта червей на активность коммерческого препарата трипсина в концентрации 0.01 мг/мл (А) и активность протеиназ слизистой оболочки кишечника синца (Б), $\Delta E_{440}/(\text{г} \times \text{мин})$.

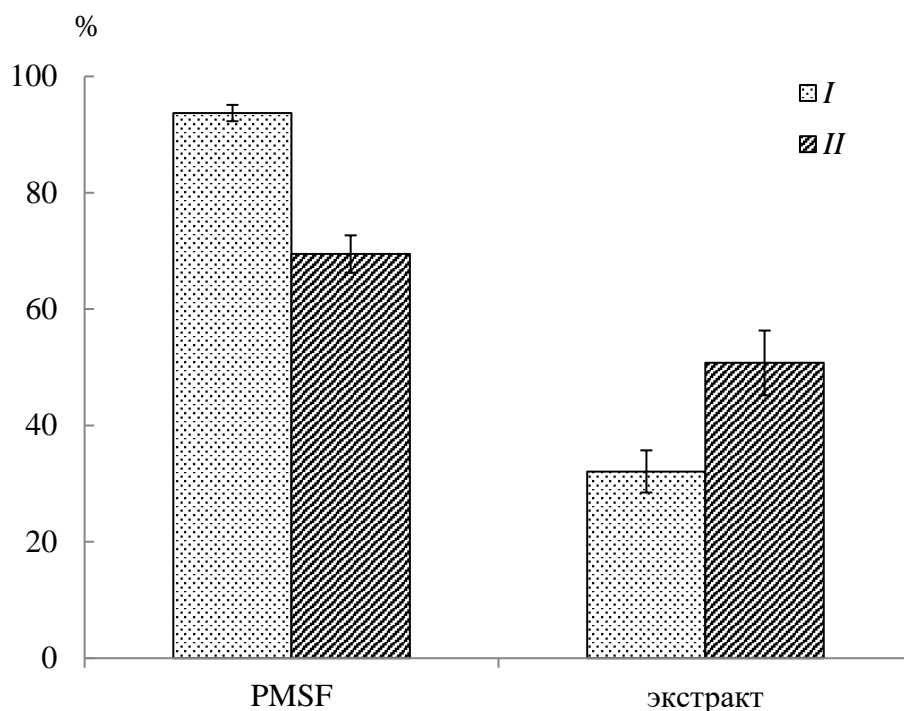


Рис. 24. Доля ингибирования активности трипсина (I) и активности протеиназ слизистой оболочки кишечника синца (II) PMSF и экстрактом червей, %.

Заключение по главе

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. Препараты *T. nodulosus* и *E. rugosum* показали больший ингибирующий эффект по отношению к коммерческому препарату трипсина, чем к протеиназам хозяина. 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. Это может быть связано как с более высоким средством

ингибитора червя с ферментами кишечника хозяина, так и с продуцированием цестодой смеси ингибиторов.

Снижение протеолитической активности слизистой 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.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение влияния цестод на организм их хозяев – рыб привлекает внимание исследователей, поскольку некоторые цестоды паразитируют в пищеварительном тракте ценных промысловых видов рыб. Однако имеющиеся сведения о влиянии этих цестод на жизнедеятельность хозяев – рыб достаточно разноречивы (Bosi et al., 2005; Boyce, Clarke, 1983; Hoffmann et al., 1986). Предполагают, что цестоды, паразитирующие в кишечнике рыб, при достаточной кормовой обеспеченности не влияют на хозяина (Bosi et al., 2005). В то же время заражение цестодами *Eubothrium salvelini* Schrank, 1790 существенно отражается на состоянии молоди нерки, в том числе на скорости ее роста, выживании и плавательной способности (Boyce, Clarke, 1983). Заражение *E. salvelini* связывают с хронической анемией арктического гольца *Salvelinus alpinus* (L.) и высокой смертностью его молоди в рыбоводных хозяйствах (Hoffmann et al., 1986). Снижение скорости роста рыб может проявляться даже при низкой интенсивности инвазии, что подтверждается отсутствием корреляции между количеством червей и массой зараженных лососей (Saksvik et al., 2001).

Проведенная нами серия исследований касалась изучения влияния цестод, обитающих в кишечнике рыб, на активность пищеварительных ферментов последних. Различные уровни активности этих ферментов у незараженных рыб связаны как с типом их питания, так и со сроками исследования. Сроки исследования рыб в нашем случае были обусловлены сроками развития цестод в окончательном хозяине и возможностью отлова рыб. Различные сроки отлова исследованных видов рыб затрудняют сравнение уровней активности их пищеварительных ферментов. Однако поскольку основная задача исследования – определение влияния заражения на эту активность, показательно сравнение не уровней активности ферментов у различных видов рыб, а изменений (снижения или повышения), вызванных заражением цестодами.

При анализе полученных нами результатов и имеющихся литературных данных сделана попытка обозначить вероятные причины изменения активности пищеварительных ферментов хозяина при заражении цестодами. Разными авторами отмечалось как снижение активности пищеварительных ферментов хозяина (Извекова, Соловьев, 2012; Pappas, Read, 1972 a, b; Pappas, Uglem, 1990), так и ее повышение (Давыдов, Куровская, 1991; Куклина, Куклин, 2011; Извекова, Соловьев, 2012). Повышение активности ферментов при заражении цестодами может быть связано, во-первых, с повреждениями слизистой оболочки кишечника прикрепительными аппаратами гельминтов (Извекова, Куклина, 2014). Одними из первых среди других ультраструктур клетки на действие повреждающих факторов, в том числе инвазии гельминтов, отвечают лизосомы. Известно, что в очагах некроза и местах внедрения в клетку чужеродных веществ происходит локальное увеличение концентрации водородных ионов, что создает кислую среду для проявления активности лизосомальных ферментов (Высоцкая, Немова, 2008). Кроме того, изоляция кишечного эпителия от стромы, а также отделение мышечно-серозного слоя от слизистой оболочки кишечника позволили установить высокую активность пищеварительных гидролаз, и в частности протеиназ, в субмукозных структурах (Уголев, Кузьмина, 1992: цит. по Извекова, Соловьев, 2016). Эти структуры могут повреждаться прикрепительными аппаратами цестод, что, в свою очередь, может приводить к увеличению активности протеиназ в кишечнике при заражении. Это согласуется с результатами наших исследований, где у зараженных синцов и ершей отмечена большая доля цистеиновых протеиназ – внутриклеточных ферментов – в общей протеолитической активности в кишечнике, что может свидетельствовать о повреждении эпителия слизистой оболочки кишечника хозяина прикрепительными аппаратами цестод *P. torulosus* и *P. cernuae* соответственно.

Во-вторых, в качестве компенсации негативного воздействия паразитов увеличивается пищевая активность хозяина (Bosi et al., 2005), что, в свою

очередь, может служить причиной повышения активности пищеварительных ферментов. В-третьих, показано, что при заражении цестодами в слизистой оболочке кишечника хозяина увеличивается количество слизистых клеток, продуцирующих муцин (Bosi et al., 2016). Муцин, в свою очередь, характеризуется высоким содержанием углеводов (Кузьмина, 1995), что также может влиять на показатели активности гликозидаз у заражённых организмов. Нами отмечено увеличение активности гликозидаз в кишечнике зараженных цестодами особей синца и повышение активности протеиназ в кишечнике ерша при высокой паразитарной нагрузке.

В связи с тем, что ранее некоторыми авторами отмечалось снижение активности пищеварительных ферментов хозяина под влиянием паразитарной инвазии, нами была поставлена задача исследовать явление ингибирования. Следует отметить, что имеющиеся сведения об ингибировании протеолитических ферментов цестодами достаточно противоречивы. Так, есть данные, свидетельствующие об инактивации протеаз при взаимодействии с живыми червями. Показано, что адсорбционная поверхность червей взаимодействует с ферментами хозяина, в результате чего изменяется их активность. Например, при инкубации *H. diminuta* с трипсином, α - и β -химотрипсином *in vitro* указанные ферменты инактивировались на поверхности червя, однако не удалось обнаружить секрецию активного ингибитора в окружающую среду (Pappas, Read, 1972 a, b). Позже было показано, что трипсин скорее адсорбируется на поверхности червя, чем поглощается им, однако адсорбция фермента не связана с его инактивацией (Schroeder, Pappas, 1980). Было выдвинуто предположение о присутствии инактиваторов, связывающих ферментные контакты трипсина на поверхности червя. Авторы предположили, что инактивация сопровождается небольшими структурными или конформационными изменениями фермента, затрагивающими только его активность в отношении высокомолекулярных субстратов, поскольку инактивированный фермент

полностью сохранял активность по отношению к низкомолекулярным субстратам (Schroeder, Pappas, 1980; Schroeder et al., 1981).

В то же время было установлено, что изолированная мембрана тегумента *H. diminuta* не устойчива к действию протеолитических ферментов и не влияет на их активность. В связи с этим было высказано предположение, что инактивация протеолитических ферментов требует метаболически активной, динамической мембраны, а изолированный препарат тегументальной мембраны не отвечает этим требованиям (Pappas, 1987). Обнаруженные нами эффекты ингибирования протеиназ средой инкубации и экстрактом цестод свидетельствуют о выделении ингибиторов червем. Возможно, выделение изолированной щеточной каймы тегумента сопровождается потерей ингибитора на одной из стадий центрифугирования, используемого для получения препарата.

При исследовании ингибиторной способности *H. diminuta*, паразитирующей в кишечнике крыс, было установлено, что солевой раствор с исходными значениями рН от 5.5 до 10.0 подкисляется червями до рН 5.0 (Uglen, Just, 1983). Было высказано мнение, что кишечные паразиты могут защищать себя от переваривания ферментами хозяина как путем регуляции рН окружающей среды, так и за счет выделения ингибиторов трипсина, или с помощью обоих механизмов (Uglen, Just, 1983). Однако нельзя полностью согласиться с этим предположением. Для рыб, в частности, установлено, что активность щелочных протеиназ проявляется в диапазоне значений рН от 5 до 10 (Соловьев и др., 2015), в то время как при содержании *T. nodulosus* в растворе Рингера значения рН снижаются до 6.4 ± 0.1 . Снижение значений рН в среде инкубации *T. nodulosus*, в основном связано с выделением в эту среду молочной кислоты (Извекова, 2001). Как большинство эндопаразитов, имея доступ к неограниченным пищевым ресурсам цестоды обладают сокращенными метаболическими путями и осуществляют неполное окисление пищевых субстратов (Сопрунов, 1987). В результате они продуцируют и выделяют большое количество частично окисленных

короткоцепочечных органических кислот (молочную, пропионовую, уксусную), снижающих рН кишечника хозяина. Это приводит к угнетению транспортных функций кишечника хозяина, в то время как переносчики глюкозы у червя лучше работают при более низких значениях рН (Halton, 1997; Dalton et al., 2004). Таким образом, паразиты достигают высокой эффективности и конкурентоспособности транспортных систем, а снижение рН в кишечнике не оказывает существенного отрицательного влияния на функционирование пищеварительных ферментов хозяина.

Несмотря на некоторую противоречивость имеющихся и полученных нами данных совершенно очевидно, что цестоды, обитающие в кишечнике окончательных хозяев, способны ингибировать активность их протеиназ. Секреция паразитом ингибиторов ферментов хозяина доказывает, что эти ингибиторы играют важную роль в жизнедеятельности паразита. Они продуцируются паразитами для предотвращения гидролиза протеиназами хозяина и выживания. Двойственность адаптации гельминтов к условиям существования проявляется во взаимоотношениях с ферментами хозяина на микроуровне: с одной стороны, паразит использует эти ферменты для гидролиза белковых компонентов пищи, с другой – осуществляет ингибирование протеиназ.

Проведенное исследование дополняет и расширяет накопленный фактический материал по исследованию взаимоотношений паразит – хозяин, складывающихся при паразитировании цестод в кишечнике окончательного хозяина. Накопление фактического материала и определение общих закономерностей и отличительных особенностей функционирования на физиолого-биохимическом уровне – важная задача при исследовании взаимоотношений у различных пар паразит – хозяин.

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* бóльшая 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 ингибиторной способности червей сопоставим с аналогичным влиянием синтетического ингибитора PMSF.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аникиева Л.В., Румянцев Е.А. 2005. Цестоды рыб озер Карелии // Проблемы цестодологии. СПб.: Рос. Акад. Наук., Паразитол. о-во, Зоол. Ин-т. С. 40–62.
2. Балаболкин М.И. 1998. Эндокринология. М.: Универсум Паблишинг. 378 с.
3. Беэр С.А. 2004. Роль фактора патогенности паразитов в эволюции органического мира // Успехи общей паразитологии Труды Института паразитологии. М.: Наука. Т. XLIV. С. 65–80.
4. Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. 2008. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. М.: Наука. 284 с.
5. Герасимов Ю.В. 2015. Ерш / В кн.: Рыбы Рыбинского водохранилища: популяционная динамика и экология. Ярославль: Филигрань. С. 323–330.
6. Герасимов Ю.В., Иванова М.Н., Столбунов И.А., Павлов Д.Д. 2015. Окунь. / В кн.: Рыбы Рыбинского водохранилища: популяционная динамика и экология. Ярославль: Филигрань. С. 331–347.
7. Голованова И.Л., Голованов В.К. 2011. Влияние абиотических факторов (температура, рН, тяжёлые металлы) на активность карбогидраз объектов питания ихтиофагов // Вопросы ихтиологии. Т. 51. № 5. С. 657–664.
8. Давыдов О.Н., Куровская Л.Я. 1991. Паразито-хозяйинные отношения при цестодозах рыб. Киев: Наукова Думка. 169 с.
9. Диксон М. 1982. Ферменты / М. Диксон, Э.М. Уэбб. Мир. 1118 с.
10. Дубовская А.Я. 1973. Исследование протеолитической активности у некоторых видов цестод // Паразитология. Т. VII. № 2. С. 154–159.
11. Дятлов М.А. 2002. Рыбы Ладожского озера (распространение, морфометрия, экология, промышленное использование). Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 281 с.

12. Жохов А.Е. 2010. Список паразитических Protozoa и Metazoa обыкновенного ерша (*Gymnocephalus cernuus*) // Журнал Сибирского федерального университета. Сер. биол. Т. 3. № 1. С. 57–81.
13. Извекова Г.И. 1991. Некоторые характеристики гидролиза белков на пищеварительно–транспортных поверхностях цестоды *Eubothrium rugosum* и кишечника ее хозяина – налима // Паразитология. Т. 25. №3. С. 244–249.
14. Извекова Г.И. 1997. Содержание белка, углеводов и транспорт глюкозы в разных частях стробилы у цестоды *Eubothrium rugosum* // Паразитология. Т. 31. № 1. С. 90–96.
15. Извекова Г.И. 2001. Физиологическая специфика взаимоотношений между *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda) и его хозяевами – рыбами // Паразитология. Т. 35. № 1. С. 60–68.
16. Извекова Г.И. 2003. Характеристика заключительных этапов углеводного обмена у цестоды *Eubothrium rugosum* (Cestoda; Pseudophyllidea) // Паразитология. Т. 37. № 6. С. 496–502.
17. Извекова Г.И. 2006. Пищевые адаптации у низших цестод – паразитов рыб // Успехи современной биологии. Т. 126. № 6. С. 630–642.
18. Извекова Г.И. 2013. Активность пищеварительных ферментов налима *Lota lota* в зависимости от заражения *Eubothrium rugosum* (Cestoda: Pseudophyllidea) // Биол. внутренних вод. № 1. С. 67–72.
19. Извекова Г.И., Куклина М. М. 2014. Заражение цестодами и активность пищеварительных гидролаз позвоночных хозяев // Успехи современной биологии. Т. 134. № 3. С. 304–315.
20. Извекова Г.И., Соловьев М.М. 2012. Активность пищеварительных гидролаз рыб при заражении цестодами // Успехи современной биологии. Т. 132. № 6. С. 601–610.
21. Извекова Г.И., Соловьев М.М. 2016. Особенности влияния некоторых цестод, паразитирующих в кишечнике рыб, на активность протеиназ хозяев // Известия РАН. Серия биологическая. № 2. С. 182–187.

22. Извекова Г.И., Соловьев М.М., Извеков Е.И. 2011. Влияние *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidea) на активность пищеварительных ферментов леща // Известия РАН. Серия биологическая. № 1. С. 61–67.
23. Извекова Г.И., Тютин А.В. 2011. Зараженность и особенности отношений паразит–хозяин в системе *Ligula intestinalis* – чехонь (*Pelecus cultratus*) в Рыбинском водохранилище // Поволжский экологический журнал. № 2. С. 137–145.
24. Кияшко В.И. 1982. Экология и трофические связи ерша *Acerina cernua* L. Рыбинского водохранилища: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 24 с.
25. Клименко В.В., Кеняня В.А. 1971. О влиянии филогении и экологии на некоторые биохимические механизмы адаптации гельминтов // Известия академии наук Латвийской ССР. № 11. С. 93–96.
26. Кузьмина В.В. 1994. Вариабельность активности некоторых ферментов слизистой кишечника рыб // Журнал эволюционной биохимии и физиологии, Т. 30. № 6. С. 753–761.
27. Кузьмина В.В. 1995. Защитная функция пищеварительного тракта рыб // Вопросы ихтиологии. Т. 35. № 1. С. 86–93.
28. Кузьмина В.В. 2015. Закономерности процессов пищеварения у рыб Рыбинского водохранилища (обзор) // Труды Института Внутренних Вод РАН. № 72 (75). С. 30–49.
29. Кузьмина В.В., Голованова И.Л., Скворцова Е.Г. 2003. Методические подходы к оценке вклада ферментов объектов питания в процессы пищеварения рыб // Вопросы ихтиологии. Т. 43. № 5. С. 705–710.
30. Кузьмина В.В., Извекова Г.И., Куперман Б.И. 2000. Особенности физиологии питания цестод и их хозяев –рыб // Успехи соврем. биологии. Т. 120. № 4. С. 384–394.

31. Кузьмина В.В., Куперман Б.И. 1983. Сравнительная характеристика мембранного пищеварения у цестод и их хозяев – рыб // Паразитология. Т. 17. Вып. 6. С. 436–442.
32. Куклина М.М., Куклин В.В. 2011. Особенности гидролиза белков на пищеварительно–транспортных поверхностях кишечника моевки *Rissa tridactyla*, L. и паразитирующей в нем *Alcataenia larina* (Cestoda: Dilepididae) // Известия РАН. Серия биологическая. № 5. С. 550–556.
33. Куклина М.М., Куклин В.В. 2012. Активность пищеварительных ферментов толстоклювой (*Uria lomvia*) и тонкоклювой (*U. aalge*) кайр при инвазии ленточными червями // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. Т. 48. № 3. С. 225–231.
34. Куклина М.М., Куклин В.В., Ежов А.В. 2009. Влияние гельминтной инвазии на пищеварительную активность моевок (*Rissa tridactyla*) из разных возрастных групп // Доклады РАН. Т. 425. № 3. С. 422–425.
35. Куперман Б.И. 1973. Ленточные черви рода *Triaenophorus* – паразиты рыб. Л.: Наука, 207 с.
36. Куперман Б.И. 1978. Биология и цикл развития *Eubothrium rugosum* (Cestoda: Pseudophyllidea) // Проблемы гидропаразитологии. С. 105–112.
37. Куперман Б.И. 1988. Функциональная морфология низших цестод. Л.: Наука. 168 с.
38. Куровская Л.Я. 1991. Сопряженность процессов пищеварения в системе *Bothriosephalus acheilognathi* – карп // Паразитология. Т. 25. № 5. С. 441–449.
39. Куровская Л.Я. 1993. Влияние низших цестод (Pseudophyllidea) на жизнедеятельность двухлеток белого амура // Паразитология. Т. 27. Вып. 1. С. 59–68.
40. Малютина Т.А. 2008. Взаимоотношения в системе паразит – хозяин: биохимические и физиологические аспекты адаптации (ретроспективный обзор) // Российский паразитологический журнал. № 1. С. 1–17.

41. Номенклатура ферментов / Ред. А.Е. Браунштейн. М.: ВИНТИ. 1979. 324 с.
42. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. 1987. Том 3 / Ред. О.Н. Бауера. Л.: Наука. 584 с.
43. Пронина С.В., Пронин Н.М. 1988. Взаимоотношения в системах гельминты–рыбы. М.: Наука. 176 с.
44. Протасова Е.Н., Куперман Б.И., Ройтман В.А., Поддубная Л.Г. 1990. Кариофиллиды фауны СССР М.: Наука. 238 с.
45. Сергеева Е.Г., Беэр С.А. 2000. Факторы паразито-хозяйинной специфичности // Актуальные проблемы общей паразитологии. Труды Института паразитологии РАН. М.: Наука. Т. XLII. С.192–204.
46. Соловьев М.М., Кашинская Е.Н., Извекова Г.И., Глупов В.В. 2015. Значения рН и активность пищеварительных ферментов в желудочно-кишечном тракте рыб озера Чаны (Западная Сибирь) // Вопросы ихтиологии. Т. 55. № 2. С. 207–214.
47. Сопрунов Ф.Ф. 1987. Молекулярные основы паразитизма. М.: Наука. 224 с.
48. Сорвачев К.Ф. 1982. Основы биохимии питания рыб. М.: Легкая и пищевая промышленность. 247.с.
49. Тютин А.В. 2001. Полицикличность сезонного развития *Proteocephalus cernuae* (Cestoda: Proteocephalidae) в условиях Рыбинского водохранилища // Биология внутренних вод. № 4. С. 22–27.
50. Уголев А. М. 1985. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л.: Наука. 544 с.
51. Уголев А.М., Иезуитова Н.Н., Масевич Ц.Г., Надирова Т.Я., Тимофеева Н.М. 1969. Исследование пищеварительного аппарата у человека (обзор современных методов). Л.: Наука. 216 с.
52. Уголев А. М., Кузьмина В. В. 1993. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеиздат. 238 с.

53. Фрезе В.И. 1965. Протеоцефалы – ленточные гельминты рыб, амфибий и рептилий. М.: Наука. Т. 5. 538 с.
54. Шишова-Касаточкина О.А., Леутская З.К. 1979. Биохимические аспекты взаимоотношений гельминта и хозяина. М.: Наука. 279 с.
55. Шишова-Касаточкина О.А., Павлов А.В. 1969. К вопросу о причинах резистентности гельминтов по отношению к протеолитическим ферментам кишечника хозяина // Труды ГЕЛАН СССР. Т. 20. С. 195–204.
56. Alarcón F.J., Martínez T.F., Barranco P., Cabello T., Díaz M., Moyano F.J. 2002. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus errugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae) // Insect Biochemistry and Molecular Biology. V. 32. P. 265–274.
57. Ansari A.A., Khan M.A., Ghatak S. 1976. *Ascaridia galli*: trypsin and chymotrypsin inhibitors // Experimental Parasitology. V. 39. P. 74–83.
58. Arnott S.A., Barber I., Huntingford F.A. 2000. Parasite-associated growth enhancement in a fish cestode system // Proceedings of the Royal Society of London. Series B. V. 267. P. 657–663.
59. Baig S., Damian R.T., Molinari J.L. et al. 2005. Purification and characterization of a metacestode cysteine proteinase from *Taenia solium* involved in the breakdown of human IgG // Parasitology. V. 131. P. 411–416.
60. Barrett J., Precious W.Y. 1995. Application of metabolic control analysis to the pathways of carbohydrate breakdown in *Hymenolepis diminuta* // International Journal for Parasitology. V. 25. No. 4. P. 431–436.
61. Bode W., Huber R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. // European Journal of Biochemistry. V. 204. P. 433–451.
62. Bosi G., Giari L., DePasquale J.A., Carosi A., Lorenzoni M., Dezfuli B.S. 2016. Protective responses of intestinal mucous cells in a range of fish–helminth systems // Journal of Fish Diseases. V. 40. P. 1001–1014.

63. Bosi G., Shinn A.P., Giari L. et al. 2005. Changes in the neuromodulators of the diffuse endocrine system of the alimentary canal of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), naturally infected with *Eubothrium crassum* (Cestoda) // Journal of Fish Diseases. V. 28. P. 703–711.
64. Boyce N.P., Clarke W.C. 1983. *Eubothrium salvelini* (Cestoda: Pseudophyllidea) impairs seawater adaptation of migrant sockeye salmon yearlings (*Oncorhynchus nerka*) from Babine Lake, British Columbia // Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. V. 40. P. 821–824.
65. Concha-Frias B., Alvarez-González C.A., Gaxiola-Cortes M.G., Silva-Arancibia A.E., Toledo-Agüero P.H., Martínez-García R., Camarillo-Coop S., Jimenez-Martinez L.D., Arias-Moscoso J.L. 2016. Partial characterization of digestive proteases in the common snook *Centropomus undecimalis* // International Journal of Biology. V. 8. No. 4. P. 1–11.
66. Dalton J.P., Skelly P., Halton D.W. 2004. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths // Canadian Journal of Zoology. V. 82. No. 2. P. 221–232.
67. Delaney A., Williamson A., Brand A. et al. 2005. Cloning and characterization of an aspartyl protease inhibitor (API-I) from *Ancylostoma* hookworms // International Journal for Parasitology. V. 35. P. 303–313.
68. Dezfuli B.S., Giari L., Arrighi S., Domeneghini C., Bosi G. 2003. Influence of enteric helminths on the distribution of intestinal endocrine cells belonging to the diffuse endocrine system in brown trout, *Salmo trutta* L. // Journal of Fish Diseases. V. 26. No. 3. P. 155–166.
69. Dimes L.E., Garcia-Carreno F.L., Haard N.F. 1994. Estimation of protein digestibility-III. Studies on the digestive enzymes from the pyloric ceca of rainbow trout and salmon // Comparative Biochemistry and Physiology. V. 109A. No. 2. P. 349–360.
70. Dzik J.M. 2006. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization // Acta Biochimica Polonica. V. 53. No. 1. P. 33–64.

71. Eshel A., Lindner P., Smirnoff P., Newton S., Harpaz S. 1993. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the European sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater // *Comparative Biochemistry and Physiology*. V. 106A. No. 4. P. 621–634.
72. Filippov A.A., Golovanova I.L. 2010. Separate and joint effect of copper and zinc in vitro on a velocity of carbohydrate hydrolysis in freshwater teleosts // *Inland Water Biology*. V. 3. No. 1. P. 96–101.
73. García-Carreño F.L., Albuquerque-Cavalcanti C., Navarrete del Toroa M. A., Zaniboni-Filho E. 2002. Digestive proteinases of *Brycon orbignyanus* (Characidae, Teleostei): characteristics and effects of protein quality // *Comparative Biochemistry and Physiology*. V. 132B. P. 343–352.
74. Golovanova I.L., Kuz'mina V.V., Chuiko G.M. et al. 2011. Impact of polychlorinated biphenyls on the activity of intestinal proteinases and carbohydrases in juvenile roach *Rutilus rutilus* (L.) // *Inland Water Biology*. V. 4. No. 2. P. 249–255.
75. González S., Fló M., Margenat M. et al. 2009. A family of diverse kunitz inhibitors from *Echinococcus granulosus* potentially involved in host-parasite cross-talk // *PLoS ONE*. V. 4. No. 9. P. 1–14.
76. Graczyk P.P. 2007. Gini coefficient: A new way to express selectivity of kinase inhibitors against a family of kinases // *Journal of Medicinal Chemistry*. V. 50. No. 23. P. 5773–5779.
77. Grasbergert B.L., Clore G.M., Gronenborn A.M. 1994. High-resolution structure of *Ascaris* trypsin inhibitor in solution: direct evidence for a pH-induced conformational transition in the reactive site // *Structure*. No. 2. P. 669–678.
78. Halton D.W. 1997. Nutritional adaptations to parasitism within the platyhelminthes // *International Journal for Parasitology*. V. 27. No. 6. P. 693–704.

79. Hawley J.H., Peanasky A.J. 1992. *Ascaris suum*: Are trypsin inhibitors involved in species specificity of ascarid nematodes? // *Experimental Parasitology*. V. 75. P. 112–118.
80. Hawley J.H., Martzen M.R., Peanasky R.J. 1994. Proteinase inhibitors in *Ascarida* // *Parasitology Today*. V. 10. No. 8. P. 308–313.
81. Hoffmann R., Kennedy C.R., Meder J. 1986. Effect of *Eubothrium salvelini* Schrank, 1790 on Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), in an alpine lake // *Journal of Fish Diseases*. V. 9. P. 153–157.
82. Hwang J.H., Lee W.G., Na B.K. et al. 2009. Identification and characterization of a serine protease inhibitor of *Paragonimus westermani* // *Parasitology Research*. V. 104. P. 495–501.
83. Ingham L., Arme C. 1973. Intestinal helminthes in rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson): absence of effect on nutrient absorption and fish growth // *Journal of Fish Biology*. No 5. P. 309–313.
84. Insler G.D., Roberts L.S. 1980. Developmental physiology of cestodes. XV. A system for testing possible crowding factors in vitro // *Journal of Experimental Zoology*. V. 211. P. 45–54.
85. Izvekova G.I., Kuperman B.I., Kuz'mina V.V. 1997. Digestion and digestive-transport surfaces in cestodes and their fish host // *Comparative Biochemistry and Physiology*. V. 118A. No. 4. P. 1165–1171.
86. Izvekova G.I., Tyutin A.V. 2014. Activity of digestive enzymes and distribution of the trematode *Bunodera luciopercae* (Müller) in the intestine of juvenile perch infected with plerocercoids of *Triaenophorus nodulosus* (Pallas) // *Inland Water Biology*. V. 7. No. 2. P. 167–171.
87. Jin X., Deng L., Li H. et al. 2011. Identification and characterization of a serine protease inhibitor with two trypsin inhibitor-like domains from the human hookworm *Ancylostoma duodenale* // *Parasitology Research*. V. 108. P. 287–295.
88. Jónás E., Rágyanszki M., Oláh J., Boross L. 1983. Proteolytic digestive enzymes of carnivorous (*Silurus glanis* L.), herbivorous (*Hypuphthalmichthys*

- molitrix* val.) and omnivorous (*Cyprinus carpio* L.) fishes // *Aquaculture*. V. 30. P. 145–154.
89. Kageyama T. 1998. Molecular cloning, expression and characterization of an *Ascaris* inhibitor for pepsin and cathepsin E // *European Journal of Biochemistry*. V. 253. No. 3. P. 804–809.
90. Kang J.M., Ju H.-L., Lee K.H. et al. 2014. Identification and characterization of the second cysteine protease inhibitor of *Clonorchis sinensis* (CsStefin-2) // *Parasitology Research*. V. 113. P. 47–58.
91. Kennedy C.R., Hine P.M. 1969. Population biology of the cestode *Proteocephalus torulosus* (Batsch) in dace *Leuciscus leuciscus* (L.) of the River Avon // *Journal of Fish Biology*. V. 1. P. 209–219.
92. Knox D.P. 2007. Proteinase inhibitors and helminth parasite infection // *Parasite Immunology*. V. 29. P. 57–71.
93. Kumar S., Garcia-Carreño F.L., Chakrabarti R., Toro M.A.N., Córdova-Murueta J.H. 2007. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency // *Aquaculture Nutrition*. V. 13. P. 381–388.
94. Laskowski M. Jr, Kato I. 1980. Protein inhibitors of proteinases // *Annual Review of Biochemistry*. V. 49. P. 593–626.
95. Leid R.W., Grant R.F., Suquet C.M. 1987a. Inhibition of equine neutrophil chemotaxis and chemokinesis by a *Taenia taeniaeformis* proteinase inhibitor, taeniaestatin // *Parasite Immunology*. V. 9. No. 2. P. 195–204.
96. Leid R.W., Grant R.F., Suquet C.M. 1987b. Inhibition of neutrophil aggregation by taeniaestatin, a cestode proteinase inhibitor // *International Journal for Parasitology*. V. 17. No. 7. P. 1349–1353.
97. Li A.H., Moon S.-U., Park Y.-K. et al. 2006. Identification and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Taenia solium* metacestode // *Veterinary Parasitology*. V. 141. P. 251–259.

98. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *Journal of Biological Chemistry*. V. 193. P. 265–275.
99. Lutterschmidt W.I., Schaefer J.F., Fiorillo R.A. 2007. The ecological significance of helminth endoparasites on the physiological performance of two sympatric fishes // *Comparative Parasitology*. V. 74. No. 2. P. 194–203.
100. Martzen M.R., Geise G.L., Hogan B.J., Peanasky A.J. 1985. *Ascaris suum*: localization by immunochemical and fluorescent probes of host proteases and parasite proteinase inhibitors in cross-sections // *Experimental Parasitology*. V. 60. P. 139–149.
101. Martzen M.R., Peanasky R.J. 1985. *Ascaris suum*: biosynthesis and isoinhibitor profile of chymotrypsin/elastase isoinhibitors // *Experimental Parasitology*. V. 59. P. 313–320.
102. Matskási I. 1978. The effect of *Bothriocephalus acheilognati* Yamaguti, 1934, infection on the protease activity in the gut of carp fry // *Parasitologica Hungarica*. V. 11. P. 51–56.
103. Matskási I. 1980. *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea): studies on the α -amylase activity of plerocercoid larvae // *Parasitologia Hungarica*. V. 13. P. 27–34.
104. Matskási I. 1984. The effect of *Bothriocephalus acheilognati* infection on the protease and α -amylase activity in the gut of carp fry // *Symposia Biologia Hungarica*. V. 23. P. 119–125.
105. Matskási I., Juhász S. 1977. *Ligula intestinalis* (L., 1758): Investigation on plerocercoids and adults for protease and protease inhibitor activities // *Parasitologica Hungarica*. V. 10. P. 51–60.
106. Matskási I., Németh I. 1979. *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidae): studies on the properties of proteolytic and protease inhibitor activities of plerocercoid larvae // *International Journal for Parasitology*. V. 9. No. 3. P. 221–227.

107. Meisler M.H., Gumucio D.L. 1986. Pancreatic amylase: molecular genetics and evolution // *Molecular and cellular basis of digestion*. Amsterdam etc. P. 249–263.
108. Merckelbach A., Ruppel A. 2007. Biochemical properties of an intracellular serpin from *Echinococcus multilocularis* // *Molecular and Biochemical Parasitology*. V. 156. P. 84–88.
109. Mitchell C.G. 1993. Eubothrium // *Aquaculture Information Series*. No. 14. P. 1–4.
110. Molehin A.J., Gobert G.N., McManus D.P. 2012. Serine protease inhibitors of parasitic helminthes // *Parasitology*. V. 139. No. 6. P. 681–695.
111. Morris S.R., Sakanari J.A. 1994. Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex* // *The Journal of Biological Chemistry*. V. 269. No. 44. P. 27650–27656.
112. Munilla-Morán R., Saborido-Rey F. 1996. Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) // *Comparative Biochemistry and Physiology*. V. 113B. No. 2. P. 395–402.
113. Natalia Y., Hashim R., Ali A., Chong A. 2004. Characterization of digestive enzymes in a carnivorous ornamental fish, the Asian bony tongue *Scleropages formosus* (Osteoglossidae) // *Aquaculture*. V. 233. P. 305–320.
114. Németh I., Juhász S., Baintner K. 1979. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Taenia pisiformis* // *International Journal for Parasitology*. V. 9. No. 6. P. 515–522.
115. Németh I., Juhász S.A. 1980. Trypsin and chymotrypsin inhibitor from the metacestodes of *Taenia pisiformis* // *Parasitology*. V. 80. No. 3. P. 433–446.
116. Németh I., Juhász S.A. 1981. Properties of a trypsin and chymotrypsin inhibitor secreted by larval *Taenia pisiformis* // *International Journal for Parasitology*. V. 11. No. 2. P. 137–144.

117. Oaks J., Knowles W., Cain G. 1977. A simple method of obtaining an enriched fraction of tegumental brush border from *Hymenolepis diminuta* // Journal of Parasitology. V. 63. P. 476–485.
118. Oaks J., Lumsden R.D. 1971. Cytochemical studies on the absorptive surfaces of cestodes. V. Incorporation of carbohydrate containing macromolecules into tegument membranes // Journal of Parasitology. V. 57. P. 1256–1268.
119. Pappas P.W. 1978. Tryptic and protease activities in the normal and *Hymenolepis diminuta*-infected rat small intestine // Journal of Parasitology. V. 64. No. 3. P. 562–564.
120. Pappas P.W. 1980. Enzyme interactions at the host-parasite interface // Cellular interactions in symbiosis and parasitism. The Ohio State University Press, Columbus. P. 145–172.
121. Pappas P.W. 1983. Alterations in brush border membrane proteins and membrane-bound enzymes of the tapeworm, *Hymenolepis diminuta*, during development in the definitive host // Molecular and Biochemical Parasitology. No. 8. P. 317–323.
122. Pappas P.W. 1987. *Hymenolepis diminuta*: interactions of the isolated brush border membrane with proteolytic enzymes // Experimental Parasitology. V. 64. P. 38–47.
123. Pappas P.W., Read C.P. 1972 a. Trypsin inactivation by intact *Hymenolepis diminuta* // The Journal of Parasitology. V. 58. P. 864–871.
124. Pappas P.W., Read C.P. 1972 b. Inactivation of α - and β -chymotrypsin by intact *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) // Biology Bulletin. V. 143. No. 3. P. 605–616.
125. Pappas P.W., Uglem G.L. 1990. *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) liberates an inhibitor of proteolytic enzymes during *in vitro* incubation // Parasitology. V. 101. P. 455–464.
126. Pietrock M., Krüger R., Meinelt T. 1998. Ecology of *Proteocephalus torulosus* in the blue bream (*Abramis ballerus*) from the Oder River on the

- borders of Germany and Poland // *Journal of Helminthology*. V. 72. P. 231–236.
127. Polzer M., Conradt U. 1994. Identification and partial characterization of the proteases from different developmental stages of *Schistocephalus solidus* (Cestoda: Pseudophyllidae) // *International Journal for Parasitology*. V. 24. No. 7. P. 967–973.
128. Pujante I.M., Díaz-López M., Mancera J.M., Moyano F.J. 2017. Characterization of digestive enzymes protease and alpha-amylase activities in the thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*, Risso 1827) // *Aquaculture Research*. V. 48. P. 367–376.
129. Rascón Jr, McKerrow J.H. 2013. Synthetic and natural protease inhibitors provide insights into parasite development, virulence and pathogenesis // *Current Medicinal Chemistry*. V. 20. 3078–3102.
130. Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A.J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors // *Biochemical Journal*. V. 378. P. 705–716.
131. Saksvik M., Nilsen F., Nylund A., Berland B. 2001. Effect of marine *Eubothrium* sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) on the growth of atlantic salmon, *Salmo salar* L. // *Journal of Fish Diseases*. V. 24. P. 111–119.
132. Scholz T. 1989. On the ecology of the tapeworm *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786) (Cestoda: Proteocephalidea) in chub (*Leuciscus cephalus* (L.)) from the River Rokytna, Czechoslovakia // *Helminthologia*. V. 26. P. 275–287.
133. Scholz T. 1993. Development of *Proteocephalus torulosus* in the intermediate host under experimental conditions // *Journal of Helminthology*. V. 67. P. 316–324.
134. Scholz T., Drabek R., Hanzelova V. 1998. Scolex morphology of *Proteocephalus* tapeworms (Cestoda: Proteocephalidae), parasites of freshwater fish in the Palaearctic Region // *Folia Parasitologica*. V. 45. P. 27–43.

135. Scholz T., Hanzelová V. 1998. Tapeworms of the genus *Proteocephalus* Weinland, 1858 (Cestoda: Proteocephalidae), parasites of fishes in Europe / ACADEMIA Publishing House of the Academy of Sciences of the Czech Republic. Praha. 120 p.
136. Scholz T., Moravec F. 1994. Seasonal dynamics of *Proteocephalus torulosus* (Cestoda: Proteocephalidae) in barbel (*Barbus barbus*) from the Jihlava River, Czech Republic // *Folia Parasitologica*. V. 41. P. 253–257.
137. Schroeder L.L., Pappas P.W. 1980. Trypsin adsorption by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) // *Journal of Parasitology*. V. 66. No. 1. P. 49–52.
138. Schroeder L.L., Pappas P.W., Means G.E. 1981. Trypsin inactivation by intact *Hymenolepis diminuta* (Cestoda): some characteristics of the inactivated enzyme // *Journal of Parasitology*. V. 67. No. 3. P. 378–385.
139. Siringan P., Raksakulthai N., Yongsawatdigul J. 2006. Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*) // *Food Chemistry*. V. 98. P. 678–684.
140. Shaw R.J., McNeil M.M., Maass D.R. et al. 2003. Identification and characterisation of an aspartyl protease inhibitor homologue as a major allergen of *Trichostrongylus colubriformis* // *International Journal for Parasitology*. V. 33. P. 1233–1243.
141. Shepherd J.C., Aitken A., McManus D.P. 1991. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis // *Molecular and Biochemical Parasitology*. V. 44. P. 81–90.
142. Shostak A.W., Dick T.A. 1986. Intestinal pathology in northern pike, *Esox lucius* L., infected with *Triaenophorus crassus* Forel, 1868 (Cestoda: Pseudophyllidea) // *Journal of Fish Diseases*. V. 9. P. 35–45.
143. Solovyev M.M., Kashinskaya E.N., Izvekova G.I., Gisbert E., Glupov V.V. 2014. Feeding habits and ontogenic changes in digestive enzyme patterns in five freshwater teleosts // *Journal of Fish Biology*. V.85. No. 5. P. 1395–1412.

144. Suquet C., Green-Edwards C., Wes Leid R. 1984. Isolation and partial characterization of a *Taenia taeniaeformis* metacestode proteinase inhibitor // International Journal for Parasitology. V. 14. No. 2. P. 165–172.
145. Taylor M., Hoole D. 1994. Modulation of fish lymphocyte proliferation by extracts and isolated proteinase inhibitors of *Ligula intestinalis* (Cestoda) // Fish Shellfish Immunology. No. 4. P. 221–230.
146. Uglem G.L, Just J.J. 1983. Trypsin inhibition by tapeworms: antienzyme secretion or pH adjustment? // Science. V. 220. P. 79–81.
147. Ugolev A.M. 1989. Membrane digestion. Modern concepts. In: Ugolev A. (ed). Membrane Digestion. New Facts and Concepts. Moscow: Mir Publishers. P. 39–116.
148. Yang Y., Wen Y., Cai Y.N. et al. 2015. Serine proteases of parasitic helminths // Korean Journal of Parasitology. V. 53. No. 1. P. 1–11.
149. Zang X. Maizels R.M. 2001. Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen // TRENDS in Biochemical Sciences. V. 26. No. 3. P. 191–197.