

**О СОДЕРЖИМОМ СРЕДНЕЙ КИШКИ ЛИЧИНОК I СТАДИИ  
ОВОДА HYPODERMA BOVIS DE GEER****В. З. Белинская, А. В. Третьяков и А. Л. Янушка**Зоологический институт АН СССР и Институт цитологии АН СССР,  
Ленинград

Выделенный из содержимого средней кишки личинок I стадии *H. bovis* экстракт содержит гомогенное белковое вещество — протеазу, наиболее активную по отношению к гемоглобину по сравнению с другими испытанными белками (альбумином и коллагеном).

Обладая высокой токсичностью, белок действует преимущественно на центральную нервную систему. Действие токсина не предотвращается введением антигистаминных и холинэстеразных средств. Интенсивность токсического действия в каждом частном случае, вероятно, зависит от количества вещества, попадающего в общее кровяное русло.

Как известно, общей биологической особенностью подкожных оводов сем. *Hypodermatidae* является жизнь личинок II и III стадий в подкожных соединительнотканых капсулах в теле хозяина. Однако для жизни в такой капсуле личинке необходимо сначала проделать в коже хозяина свищевое отверстие. В течение I стадии личинки подкожных оводов накапливают в средней кишке активное по своему действию на ткани хозяина вещество, которое Оно (Ono, 1932) назвал «гиподерматоксином». В дальнейшем это вещество и используется для образования свища в коже хозяина.

Механизм образования свища связан с протеолитической активностью содержимого средней кишки. Как выяснилось, это вещество обладает и токсическими свойствами (Ono, 1936; Lienert a. Thorsell, 1955; Beesley, 1965, 1969). Мы попытались выделить, очистить и идентифицировать протеолитическое и токсическое начало в содержимом средней кишки личинок I стадии подкожного овода *H. bovis*. Работа выполнена в лаборатории биохимии клетки Института цитологии АН СССР.

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА**

Личинки I стадии *H. bovis* получали на Ленмясокомбинате им. С. М. Кирова на конвейере от молодняка крупного рогатого скота из эпидуральной ткани позвоночного канала и транспортировали на льду в физиологическом растворе. Всего было получено для опытов 142 личинки. В лаборатории тщательно отмывали их в таком же растворе и извлекали среднюю кишку, содержимое которой растворяли в 0.08 М растворе NaCl. Раствор центрифугировали при 3000 г 8 мин. на холоду. Супернатант был прозрачен. Осадок, содержащий обрывки ткани кишечника, отбрасывали.

Предварительное исследование содержимого кишечника для определения активной фракции показало, что активность проявляет только белковый компонент содержимого, тогда как супернатант после осаждения белка не оказывал никакого действия на подопытных животных при введении подкожно. Поэтому все внимание было уделено белковой фракции. Были поставлены две серии опытов. В первой серии белок супернатанта

концентрировали путем осаждения 3М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Чистоту осаждения контролировали прибавлением 20% трихлоруксусной кислоты. Затем растворяли белок в малом объеме 0.08 М раствора NaCl (2 мл объема содержали 14 мг белка) и ставили на диализ против такого же раствора NaCl. Осажденный раствор белка хроматографировали на колонке с сефадексом G-200 (размер колонки  $21 \times 1.2$ ). Во второй серии сырой экстракт освобождали от тканевых остатков, растворяли в физиологическом растворе и хроматографировали на такой же колонке.

Элюантом при хроматографии в обеих сериях служил 0.08 М раствор NaCl, добавляемый в колонку со скоростью 8 мл в час. Концентрацию белка в растворах определяли на спектрофотометре (СФ-4) по степени поглощения (экстинции) света при длине волны 280 нм. После колонки весь белок первой серии концентрировали на пленочном испарителе до 2 мл объема, во второй серии концентрацию проводили по мере необходимости.

Ферментативные реакции ставили при  $37^\circ$  на кристаллическом гемоглобине, бычьим коллагене и сывороточном альбумине при pH 7.4. Исследуемый белок прибавляли к субстрату в отношении 1 : 250. Реакцию останавливали прибавлением 10% трихлоруксусной кислоты. Нерасщепленный белок осаждали центрифугированием при 1000 g 10 мин. Экстинцию супернатанта на присутствие свободных аминокислот измеряли на СФ-4 при длине волны 280 нм. Реакция с гемоглобином была поставлена однократно, с альбумином и коллагеном — дважды.

Для выяснения токсических свойств препарат вводили подкожно и внутривенно белым беспородным мышам обоего пола, весом в среднем 10 г, в количестве 3.5 мг белка; кроме того, одной мыши было введено 0.5 мг, другой 4.5 мг белка. Были также поставлены опыты по предупреждению летальности холинэстеразами и противогистаминными препаратами. В качестве антидотов служили атропин и димедрол (1 мл 10% раствора подкожно).

Контрольным мышам вводили в таком же количестве супернатант после осаждения белка, бычий альбумин, физиологический раствор, прокипяченный в течение 3 мин. исследуемый осажденный белок.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Хроматография на колонке как сырого, так и сконцентрированного высаливанием содержимого средней кишки личинок I стадии *H. bovis* показала один пик (см. рисунок), что указывает на гомогенность полученного препарата. Результаты опытов по сравнительной активности протеолиза гемоглобина, бычьего коллагена и сывороточного альбумина свидетельствуют, что по скорости расщепления препараты можно расположить в следующий ряд: гемоглобин, сывороточный альбумин, бычий коллаген, так как разница в экстинции по отношению к контролю составляла для гемоглобина через 30 мин. инкубации — 0.540, для альбумина через 24 часа — 0.380, для коллагена через 24 часа — 0.120. Эти данные позволяют отнести полученный препарат к протеазам.

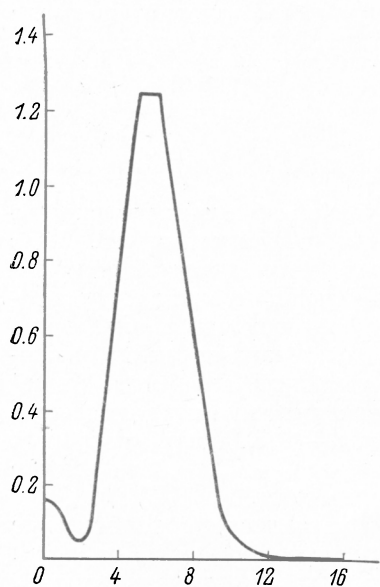
Были поставлены две серии опытов на протеолитическое и токсическое действие содержимого средней кишки. Их результаты приведены в таблице. Из таблицы видно, что супернатант после полного осаждения белковой фракции, равно как и прокипяченный в течение 3 минут белок, не оказывали никакого действия. Наиболее ярко токсическое действие проявилось в осажденном белке. Некоторое снижение активности белка после колонки подтверждает общее правило — хроматография в определенной мере снижает ферментативную активность белков. Из приведенных данных можно сделать вывод, что протеолиз и токсичность обусловлены одной и той же белковой субстанцией.

Патологоанатомическое вскрытие погибших животных показало на месте введения картину быстрого гистолиза, которая не отличается от описанной ранее Оно и Бисли (Опо, 1936; Beesley, 1969). По местному

**Результаты действия гниодерматоксина при подкожном введении белым беспородным мышам**

Количество животных в опыте	Вводимое вещество	Количество на 1 животное весом 10 г в мг	Время образования свища		Время наступления смерти	
			средние	пределы	средние	пределы
5	Осажденный $3M(NH_4)_2SO_4$ белок	3.5	—	—	6.5 мин.	5—8 мин.
5	Сырой экстракт содержимого средней кишки	3.5	56 мин.	45 м.—1ч.10 м.	3 ч. 15 м.	1ч. 30м.—5ч.
5	Белок после колонки	3.5	50 мин.	40 м.—1 ч.	2 ч. 45 м.	1ч.—4ч. 30м.
5	Супернатант после осаждения всего белка	3.5	—	—	—	—
5	Сывороточный альбумин	3.5	—	—	—	—
5	Физиологический раствор	3.5	—	—	—	—
5	Прокипяченный белок	3.5	—	—	—	—
2	Белок инактивированный при 42°	3.5	—	—	—	—
1	Сырой экстракт содержимого	0.5	6 час.	—	9 час.	—
1	Сырой экстракт содержимого	4.5	—	—	0.5 час.	—

характеру действия препарат поливалентен и оказывает действие на различные гистологические структуры. Это вполне понятно, так как для образования свищевого отверстия должны быть разрушены различные ткани: соединительная, эпителиальная мембраны белкового, липидного и другого происхождения.



Гель-фильтрация на сефадексе  
D=200.

По оси абсцисс — номера пробирок;  
по оси ординат — экстинция.

Общая токсическая реакция связана, по-видимому, с попаданием высокоактивной протеазы в кровь при разрушении сосудов и с ее воздействием на центральную нервную систему, в частности на бульбарные центры продолговатого мозга. Такой вывод вытекает из наблюдавшихся общих симптомов отравления — непроизвольного сокращения гладкой мускулатуры, паралича конечностей, ригидности поперечнополосатой мускулатуры и наступления смерти от паралича дыхательного центра. В пользу центрального механизма нарушения и остановки дыхания токсической субстанцией свидетельствует отсутствие отека легких (проба на плавучесть). Столь яркая картина смерти животных проявляется при введении осажденного белка (3.5 мг). При введении сырого экстракта (3.5 мг) и белка после колонки в таком же количестве картина становится растянутой во времени и интенсивности проявления симптомов. Инъекция 0.5 мг белка вызвала смерть животного только через 9 час.,

4.5 мг белка — через полчаса. Димедрол и атропин не предотвращают гибели животных, однако димедрол несколько удлинил продолжительность жизни животного, что можно объяснить его центральным седативным и периферическим антигистаминным действием.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В свое время Оно (1932) ввел термин «гиподерматоксин» для обозначения содержимого средней кишки личинок оводов I стадии. Однако вопрос о природе, физико-химических и токсических свойствах содержимого изучен недостаточно. Расплывчатость данных по этому вопросу обусловлена, на наш взгляд, отсутствием достаточно надежного теста для изучения свойств субстанции.

Оно (1938) ставил опыты с гиподерматоксином и по характеру действия описал его дермолитическое действие. Он указывает на термолабильность вещества, на способность его сохранять некоторые свойства после 30-минутной инактивации при 70°. Мы в своих опытах не наблюдали такой стойкости гиподерматоксина — нагревание до 42° снимает его активность, равно как и трехминутное кипячение. Линерт и Торзелл (Linert a. Thorsell, 1955) испытывали автолизат из личинок *H. bovis* на эпидуральном жире, кожном коллагене, гиалуровой кислоте, хондриотинсерной кислоте хряща и получили активность только по отношению к коллагену. Это закономерно, потому что, несмотря на поливалентный характер своего действия, гиподерматоксин имеет назначением образование свищевого отверстия и картина протеолиза разыгрывается в соединительной ткани, где специфическим субстратом из всех испытываемых Линертом и Торзеллом является только коллаген. Содержимое средней кишки не расходуется, вероятно, в период миграции личинки. Этим еще раз подтверждается предположение, что основное и единственное назначение содержимого средней кишки личинок I стадии — образование свища.

Учитывая, что картина патолого-анатомического вскрытия обнаруживает серьезные изменения (при образовании свища) со стороны крови, мы выбрали в качестве субстрата для определения ферментативной активности не только коллаген, но и гемоглобин. Результаты показали очень высокую активность гиподерматоксина по отношению к этому белку. Пока трудно сказать, имеет ли эта особенность содержимого средней кишки какое-либо функциональное назначение. Возможно, таким путем предотвращается образование кровяных сгустков и закупорка отверстия свища в период линьки личинки, происходящей сразу после образования свища.

Почти с самого начала широкого применения системных инсектицидов для уничтожения личинок I стадии подкожных оводов крупного рогатого скота в литературе дискутируется вопрос о причинах острых токсических реакций (синдром параплегии и паралича конечностей) и смерти (правда, в очень небольшом проценте случаев) животных после введения инсектицидов (Weintraub a. Thompson, 1960; Scharff, Sharman, Ludwig, 1962; Rich, 1965; Beesley, 1966; Rosenberger, 1966). До сих пор, однако, далеко не всегда удавалось точно установить причины этих реакций: связаны ли они с повышенной реактивностью животных на фосфорорганические соединения или являются результатом массовой гибели личинок оводов и поступлением в окружающие ткани содержимого их средней кишки, особенно когда дело касается личинок *H. bovis*, паразитирующих в эпидуральной ткани позвоночного канала. В опытах Хана (Khan, 1969) было установлено, что средняя кишка личинок I стадии опустошается после их гибели в результате обработки животных системными инсектицидами. Однако частота возникновения заболеваний и острота наблюдаемых симптомов не соответствовали количеству погибших личинок *H. bovis*, находившихся в эпидуральной ткани. Поэтому возникло сомнение, могут ли вообще субстраты из погибших личинок быть причиной заболеваний.

Положение осложняется еще и тем, что до сих пор нет полной ясности в возможном механизме действия субстратов — имеем ли мы дело с прямым токсикозом или с анафилактической реакцией на чужеродный белок. В последних наиболее точных опытах Андерсена и Кирквуда (Andersen a. Kirkwood, 1969) не заражавшимся ранее оводом телятам внутривенно вводили гемолимфу и содержимое кишечника разного количества личинок

I стадии *H. bovis*. Одно из животных было предварительно сенсibilизировано меньшим количеством того же субстрата. Результаты показали, что реакция животных объясняется, скорее всего, прямым отравлением, а не анафилаксией.

Результаты наших опытов свидетельствуют о том, что наиболее сильное общее действие субстратов тела личинок I стадии на организм хозяина связано, вероятно, с проникновением протеазы содержимого средней кишки в бульбарные центры продолговатого мозга. Наблюдаемые нами картины отравления у опытных животных были сходны с известными из литературы симптомами заболеваний крупного рогатого скота после введения системных инсектицидов.

Однако на практике острота симптомов может быть очень изменчива, поскольку она зависит от количества субстрата, попадающего с током крови в продолговатый мозг. Доза эта может зависеть: 1) от количества погибших личинок; 2) от количества протеазы в их средней кишке, которое, как нам пришлось убедиться, далеко не одинаково даже у сходных по величине личинок; 3) от обилия кровеносных сосудов в местах гибели личинок, что влияет на вероятность попадания протеазы содержимого кишки в общее кровяное русло хозяина; 4) от физиологического состояния хозяина. Всеми этими обстоятельствами и объясняется, видимо, значительное разнообразие побочных явлений при обработках скота системными инсектицидами для борьбы с подкожными оводами.

Для точного выяснения реакции крупного рогатого скота на протеазу личинок необходимо прежде всего отработать методику дозировки вводимого субстрата и манипулировать не с содержимым всей личинки, как в опытах Андерсена и Кирквуда (1969), или даже их средней кишки вообще, а получать чистый белок — протеазу и вводить его в определенных количествах. Количественный градиент протеазы будет, вероятно, иметь существенные различия и при сравнительном изучении личинок разных видов подкожных оводов. Весьма вероятно, что именно количественным содержанием протеазы можно будет объяснить в определенной мере приспособленность видов оводов к различным хозяевам и способность образовывать свищ в коже хозяина при накоплении различной концентрации гиподерматоксина в зависимости от толщины кожи хозяина (Бреев, 1967а, 1967б).

Литературные данные о протеолитической активности энзимов, личинок мясных мух *Lucilia sericata*, *L. cuprina*, *Callitroga hominivorax* (Hobson, 1931; Esselinger a. Chandler, 1959), а также энзима личинок последних стадий оводов (Simmons, 1939) и ряда гельминтов (Lewert a. Lee, 1957) указывают на определенную сравнимость механизмов их действия с действием энзима личинок I стадии *H. bovis*. Однако ни один из описанных видов не может сравниться с личинками I стадии оводов по силе протеолиза энзима, разрушительности его действия. Очень высокая концентрация энзима объясняет, с одной стороны, каким образом личинке удается проделать свищ на участках с наиболее толстым кожным покровом, а с другой — большую токсичность энзима.

Авторы приносят благодарность старшему научному сотруднику Лаборатории биохимии клетки ЦИН АН СССР Н. М. Несветаевой за полезные советы, ст. научному сотруднику Отдела микробиологии ВИЭМ АМН СССР О. А. Ротштейн за предоставление коллагена, начальнику ОПВК Ленмясокомбината им. С. М. Кирова А. А. Кузьмину за создание отличных условий для сбора личинок подкожного овода.

#### Л и т е р а т у р а

- Б р е е в К. А. 1967а. Новые данные о миграции личинок I стадии *Hypoderma bovis* De Geer. в организме хозяина. Паразитолог. сб. ЗИН АН СССР, 23 : 191—220.  
Б р е е в К. А. (Breyev). 1967б. On the variability of developmental periods of 1-st instar larvae of *Hypoderma bovis* De Geer and the causes of their migration in host organism. *Wiadomosci Parazytol.*, 13 (4—5) : 579—584.

- Anderson P. H. and Kirkwood A. C. 1969. A reaction in cattle to toxins of *Hypoderma bovis* (warble-fly) larvae. *Rev. Veterin. Sci.*, 10 (1) : 29—33.
- Beesley W. N. 1965. Recent work on the ox warble-flies (*Hypoderma*). *Veterin. Bull.*, 31 (1) : 1—6.
- Beesley W. N. 1969. Observations on the biology of the ox warble fly (*Hypoderma*: Diptera, Oestridae). *Ann. Tropical Medicine and Parasitol.*, 63 (2) : 157—160.
- Esslinger J. H. and Chandler A. C. 1959. Studies on the Properties of the metabolic products of the screw-worm, *Callitroga hominivorax* (Coquerel). *Exp. Parasitol.*, 8: 527—539.
- Hobson R. F. 1931. On an enzyme from blow-fly larvae, *Lucilia sericata*, which digests Collagen in alkaline solution. *Biochem. Journ.*, 25 : 1458—1462.
- Khan M. A. 1969. Significance of spinal stage *Hypoderma* larvae in systemic insecticide toxicity. *Res. Veterin. Sci.*, 10 (4) : 355—360.
- Lewert R. M. and Lee C. L. 1957. The collagenaselike enzymes of skin-penetrating helminths. *Am. Journ. Trop. Med. Hyg.*, 6 : 473—479.
- Lienert E. a. Thorsell W. 1955. Untersuchungen über die Aktivität von Autolysaten aus Wanderlarven (*Hypoderma bovis*) auf Elemente des Bindegewebes. *Expl. Parasitol.*, 4 (3) : 117—125.
- Ono S. 1932. Studies on hypodermatotoxin toxin obtained from the larvae of *Hypoderma* sp. at the oesophageal stage. *Journ. Jap. Soc. vet. Sci.*, 11 : 44.
- Ono S. 1938. Studies on warble flies of Manchuria and Inner Mongolia. *Kitasato Arch., exp. medic.*, 15 (3) : 199—246.
- Rich G. B. 1965. Post-treatment reactions in cattle during extensive field tests of systemic organophosphate insecticides. *Canad. Journ. Compar. Med. and Veterin. Sci.*, 29 (2) : 30—37.
- Rosenberger G. 1967. Beitrag zur Frage der Vertraglichkeit von systemisch wirkenden Präparaten zur Dasselbekämpfung. *Schweiz. Arch. Tierheilkunde*, 109 (1) : 21—27.
- Scharff D. K., Sharmarman G. A. M. a. Ludwig P. 1962. Illness and death in calves induced by treatments with systemic insecticides for the control of cattle grubs. *Journ. Amer. Veterin. Med. Assoc.*, 141 (5) : 582—587.
- Simmons S. W. 1939. Digestive enzymes of the larva of the cattle grubs *Hypoderma lineatum* (De Villiers). *Ann. ent. Soc. Amer.*, 32 (3) : 621—627.
- Weintraub J. and Thompson C. O. M. 1960. Comparison of Ronnel, DOWCO 109 and DOWCO 105 for systemic control of cattle grubs in Alberta. *Journ. Econ. Entom.*, 54 (1) : 79—84.

---

ON MIDGUT CONTENT OF THE FIRST INSTAR LARVAE  
OF *HYPODERMA BOVIS* DE GEER

V. Z. Belinskaya, A. V. Tretjakov and A. L. Janushka

S U M M A R Y

Extract obtained from midgut content of I-st instar larvae of *Hypoderma bovis* De Geer contains homogenous protein substance, protease. This substance is more active in relation to haemoglobin as compared with other proteins tested (albumin, collagen). Being very toxic protein affects mainly the central nervous system. The effect of toxin is not prevented by introduction of antihistamine and cholinesterase substances. The intensity of toxicity in each particular case depends apparently on the amount of substance entering the blood channel.

---