

ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА ЖИРА
В ПРИСУТСТВИИ *LAMBLLIA DUODENALIS* (IN VITRO)

Р. Ф. Акимова, И. И. Бенедиктов, М. М. Соловьев

Институт медицинской паразитологии и тропической медицины
имени Е. И. Марциновского Министерства здравоохранения СССР, Москва

Изучено влияние *L. duodenalis* из культуры на гидролиз трибутирина липазой. Двумя методами (колориметрическим и потенциометрическим) показано, что в присутствии лямблий скорость гидролиза замедляется. Степень торможения прямо зависит от количества паразитов.

Своеобразие представителей рода *Lambllia* заключается в том, что в отличие от большинства паразитических простейших кишечника они обитают не в толстой, а в тонкой кишке, где идут интенсивные процессы гидролиза пищевых веществ и всасывание продуктов гидролиза. Некоторые особенности строения лямблий указывают на то, что они приспособлены к обитанию на специфической для тонкого кишечника структуре — щеточной кайме кишечного эпителия и их жизнедеятельность тесно связана с процессами, проходящими в ней (Соловьев, 1968; Mueller a. oth., 1973).

Исследования по взаимодействию лямблий с пищеварительными ферментами *in vitro* не проводились, хотя они представляют несомненный интерес как с точки зрения оценки взаимоотношений их с организмом хозяина, так и изучения физиологии этих простейших. В нашей предыдущей работе (Акимова с соавт., 1974) сообщалось, что лямблии не влияли на гидролиз крахмала амилазой. Настоящая работа является продолжением этих исследований и посвящена изучению взаимодействия лямблий с процессами расщепления жира липазой.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Опыты проводились на моноксенической культуре *L. duodenalis*, растущей совместно с пекарскими дрожжами на модифицированной среде Карапетяна — КМ (Соловьев с соавт., 1970). Штамм был выделен в мае 1973 г.

Изучение влияния интактных лямблий на ферментативный гидролиз жиров проводилось двумя методами. По методике А. М. Уголева и М. Ю. Черняховской (1969) изучались заключительные стадии гидролиза. При этом оценивалось количество образовавшегося глицерина за 15 мин в инкубационной смеси, содержавшей и не содержавшей лямблий.

В качестве субстрата (жира) использовали 0.04%-й раствор трибутирина ($C_{15}H_{26}O_6$), а в качестве фермента 0.1%-й раствор липазы (фирмы «Flatters» и «Cornett», Англия). Растворы готовили непосредственно перед опытом. Раствор липазы фильтровали через бумажный фильтр.

Для опыта выбирали флакон с хорошим ростом — 400—500 трофозоитов на стенке флакона в поле зрения микроскопа со слабым увеличением (7×8). Легким покачиванием флакона в горизонтальной плоскости смы-

вали дрожжи со стенки, полностью удаляли среду из флакона и двукратно промывали внутреннюю поверхность теплым (37°) раствором Рингера. Такая промывка обеспечивала удаление остатков среды и дрожжей из флаконов, тогда как лямблии оставались прикрепившимися к стеклу. В отмытые флаконы вносили 3 мл раствора трибутирина и 2 мл липазы. Зависимость интенсивности гидролиза от количества лямблий изучали в специальных опытах. Во флаконы с культурой после промывки вносили по 3 мл холодного раствора Рингера, и флаконы энергично встряхивали для удаления лямблий со стенок. Взвесь лямблий в растворе Рингера переносили в стерильные пробирки, тщательно перемешивали и от 2 до 6 мл переносили в чистые инсулиновые флаконы, получая таким образом в них разное количество лямблий. Флаконы помещали в термостат (37°) на 30 мин для прикрепления лямблий к стенкам. Затем из каждого флакона удаляли раствор Рингера и вносили инкубационную смесь.

В контроле смесь, содержащую 3 мл трибутирина и 2 мл липазы, вносили в чистые флаконы без лямблий. Контрольные и опытные флаконы инкубировали 15 мин в термостате (37°) в аппарате для вращающихся пробирок. Лямблии в течение этого времени оставались жизнеспособными. Для определения количества образовавшегося глицерина использовали реакцию окисления его с иодной кислотой, при которой образуется формальдегид. При добавлении хромотроповой кислоты формальдегид в присутствии 24*N* серной кислоты образует соединения фиолетового цвета.

В химические пробирки, соответствующие числу инкубируемых флаконов, наливали по 2 мл инкубата, 0.1 мл 10*N* H₂SO₄ и добавляли 0.5 мл 0.1 М раствора HJO₄. Точно через 5 мин после добавления иодной кислоты в каждую пробу приливали 0.5 мл 10%-го раствора метабисульфита Na, перемешивали, после чего в пробах появлялось слегка желтоватое окрашивание. 1 мл пробы переносили в другую пробирку и добавляли 5 мл раствора хромотроповой кислоты следующего состава: 1 г кислоты разводили в 100 мл воды и смешивали с 450 мл 24*N* H₂SO₄. Пробу перемешивали и ставили на 30 мин в кипящую водяную баню. После охлаждения до комнатной температуры проводили колориметрию проб на фотоэлектроколориметре ФЭК-М с зеленым светофильтром.

В качестве стандарта использовали 0.001%-й раствор глицерина, приготовленный на растворе Рингера, из которого для каждой серии опытов готовили ряд разведений, содержавших от 5 до 50 мкг глицерина в 1 мл и строили калибровочную кривую. Затем рассчитывали среднюю концентрацию (K_{cp}) данного ряда стандартов. Значения K вычисляли по формуле $K = \text{мкг глицерина} / \text{экстинкция пробы}$. Количество глицерина в каждой пробе определяли по формуле: экстинкция пробы = $K_{cp} \cdot \text{экстинкция пробы}$.

Вторая серия опытов преследовала цель установление кинетики данной ферментативной реакции в присутствии лямблий и без них. Как известно, ферментативное расщепление жира сопровождается подкислением реакционной среды за счет образования жирных кислот. Это позволило провести определение активности липазы методом компенсационной потенциометрии, используя титратор датской фирмы «Radiometer» TTT2 с автоматической бюреткой ABU12 (Бенедиктов, 1975). Запись кинетики реакции фиксировалась на ленточном самописце SBR2. Постоянная величина рН 7.4 поддерживалась автоматически 0.003*N* раствором NaOH.

Лямблий, отмытых от дрожжей описанным выше способом, отделяли от стенок флакона встряхиванием с холодным раствором Рингера, переносили в центрифужную пробирку и осаждали при 1500 об/мин в течение 10 мин. Осадок перемешивали с 1 мл раствора Рингера и переносили в реакционную камеру прибора, куда добавляли 6.5 мл 0.04%-го раствора трибутирина и 2 мл 0.1%-го раствора липазы. Реакцию проводили при температуре 37° при постоянном перемешивании. Скорость реакции выражали в нм MN⁺ в 1 мин.

Степень торможения выражали в процентах по отношению к контрольной пробе, не содержащей лямблий. Для расчета брали среднюю скорость гидролиза за первые 5 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В табл. 1 приведены результаты опытов определения заключительных стадий гидролиза трибутирина. Каждая цифра в таблице является средним значением 2—3 флаконов. Из приведенной таблицы видно, что в различных опытах наблюдались колебания в количестве образовавшегося в ходе гидролиза глицерина. Однако во всех случаях количество глицерина в опытных флаконах было меньше, чем в контрольных. Сравнение средних значений образовавшегося глицерина в опытных и контрольных флаконах показывает, что разница между ними статистически достоверна ($t=4.5$, $p > 0.95$).

Т а б л и ц а 1

Определение заключительных стадий гидролиза трибутирина липазой в присутствии лямблий и без них (колориметрический метод)

№№ опытов	Количество глицерина (мкг) за 15 мин инкубации	
	опыт	контроль
1	11.5	14.5
2	10.8	13.4
3	12.0	13.0
4	12.4	14.4
5	12.0	13.7
6	11.0	12.8
7	12.8	13.7
В среднем ($\bar{x} \pm s_x$)	12.0 ± 0.8	13.8 ± 0.8

Результаты зависимости гидролиза от количества лямблий во флаконах приведены в табл. 2. Каждая цифра в ней является средней из 5—8 флаконов.

Т а б л и ц а 2

Ферментативный гидролиз трибутирина в зависимости от количества лямблий

Число лямблий на стенке флакона в одном поле зрения микроскопа (увел. 7 × 8)	Количество глицерина (мкг) за 15 мин инкубации		Степень достоверности (t) при сравнении с контролем
	x	s	
Отсутствуют (контроль)	16.0	0.4	
100—200	14.7	1.3	2.1
300—400	12.9	1.9	1.7
500—600	9.4	0.9	13.2

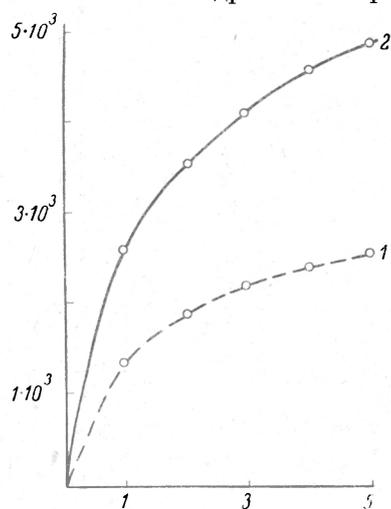
Из материала, представленного в таблице, видно, что количество образовавшегося глицерина было в обратной зависимости от количества лямблий. Оно было наиболее высоким во флаконах с минимальным количеством организмов (100—200 лямблий в поле зрения) и наиболее низким при максимальном числе их (500—600 в поле зрения).

С другой стороны, количество глицерина в опытных флаконах всегда было меньшим, чем в контрольных. Разница между контролем и опытом была, однако, статистически недостоверной в сериях с малым и умеренным количеством лямблий ($p < 0.95$), но становилась значимой ($t=13.2$, $p > 0.99$) при большом количестве лямблий во флаконах. Таким образом,

Т а б л и ц а 3
Влияние лямблий на скорость гидролиза трибутирина липазой
(потенциометрический метод)

№№ опыта	Средняя скорость гидролиза в нм МН ⁺ в мин		Процент торможения
	опыт	контроль	
1	330	564	41.0
2	280	564	49.5
3	433	600	29.0
4	434	672	36.5
5	473	740	36.0
6	524	743	38.0
7	544	813	33.0
В среднем	434 ± 0.08	677 ± 0.09	37.6 ± 2.4

полученные данные свидетельствуют о том, что степень замедления ферментативного гидролиза жира зависит от количества лямблий.



Скорость гидролиза трибутирина липазой в присутствии лямблий и в контроле.

По оси абсцисс — время гидролиза (в мин), по оси ординат — скорость гидролиза нм МН⁺ в 1 мин). 1 — гидролиз в присутствии лямблий, 2 — то же в контроле.

При потенциометрическом методе определения скорости гидролиза трибутирина липазой мы смогли изучить кинетику данной ферментативной реакции.

Скорость гидролиза была очень высокой в течение первых 5—7 мин реакции. В дальнейшем реакция замедлялась и прекращалась через 6—12 мин от начала.

В табл. 3 представлены данные о влиянии лямблий на скорость гидролиза, каждая цифра является средней из 2—3 постановок.

Средние значения скорости гидролиза в опыте и контроле различались статистически достоверно ($t=4.6$ $p > 0.95$). В соответствии с этим во всех опытах наблюдалось торможение реакции, которое колебалось от 29 до 49.5% и составляло в среднем $37.6 \pm 2.4\%$.

На рисунке представлена скорость реакции в присутствии лямблий и без них. В присутствии лямблий с самого начала и в любой другой промежуток времени угол наклона вычерчиваемой кривой меньше, чем в контрольных наблюдениях, что свидетельствует о замедлении скорости реакции с самого ее начала. Таким образом, тормозящее влияние лямблий сохраняется на протяжении всего времени гидролиза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты настоящей работы, полученные двумя различными методами, однозначно указывают на то, что присутствие интактных лямблий в инкубационной смеси тормозит ферментативный гидролиз трибутирина липазой, что наблюдается на всем протяжении гидролиза, и степень торможения зависит от количества лямблий.

В опытах с гельминтами (Ruff, Read, 1973) в качестве одной из возможных причин тормозящего воздействия *Hymenolepis diminuta* на гидролиз жира липазой высказывалось предположение, что активные участки

фермента блокируются в результате адсорбции на поверхности гельминта. Наши данные не позволяют ни принять, ни отвергнуть эту гипотезу. Однако наряду с ней возможны предположения, что лямблии способны выделять субстанции, инактивирующие фермент, а также использовать субстрат или продукты реакции.

При анализе обнаруженного явления нам представляется целесообразным обратить внимание на то, что липаза, очевидно, является фактором, неблагоприятным для лямблий. В пользу этого говорят опыты (Roux, Escalle, 1968), обнаружившие замедление роста культуры лямблий в присутствии этого фермента в среде. Поэтому не исключено, что обнаруженное нами снижение активности липазы свидетельствует о наличии у лямблий защитного механизма от ее неблагоприятного влияния.

Феномен подавления активности пищеварительных ферментов наблюдается не только у паразитов. Этим свойством обладает интактная человеческая слизистая оболочка кишечника (Borgstrom a. oth., 1957; Goldberg a. oth., 1969). По-видимому, это уникальный механизм защиты живых клеток от переваривания пищеварительными ферментами, так как в специальных исследованиях показано, что погибшие клетки утрачивают эту способность.

Полученные нами данные должны быть обсуждены и в связи с тем, что в клинических исследованиях неоднократно отмечалась стеаторея при инфекции лямблиями (Antia a. oth., 1966; Зальнова, Ишмухамедов, 1966; Moreski, Parker, 1967).

Однако ответить на вопрос о том, насколько полученные нами данные связаны с этим явлением, достаточно сложно. Асс (1963), а также Н. А. Дехкан-Ходжаева (1970) сообщили о понижении активности ферментов поджелудочной железы у больных, зараженных лямблиями. В то же время из работ, посвященных непосредственному изучению возможных причин развития стеатореи при лямблиозе, следует, что она зависит от нарушения всасывания продуктов гидролиза, а не от подавления ферментативной активности. Таким образом, вопрос о том, в какой степени подавление лямблиями ферментативного гидролиза жира отражается на процессах кишечного пищеварения, требует еще дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Ферментативный гидролиз трибутирина липазой *in vitro* замедлялся в присутствии интактных лямблий *L. duodenalis*.
2. Тормозящее влияние лямблий наблюдалось на протяжении всего времени гидролиза и коррелировало с количеством паразитов.
3. Обнаруженное явление, возможно, отражает механизм защиты лямблий от переваривания липазой в кишечнике.

Л и т е р а т у р а

- А к и м о в а Р. Ф., С о л о в ь е в М. М., К о з ь о к П. М. 1974. Изучение влияния *Lambliа duodenalis* на ферментативный гидролиз крахмала *in vitro*. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 4 : 456—458.
- А с с И. Д. 1963. Влияние лямблиоза на гепато-билиарную и гастро-панкреатическую системы у детей и сравнительная оценка некоторых методов его лечения. Сб. дисс. работ сотрудников Украинского ин-та усовершенствования врачей, 3 : 83—89.
- Д е х к а н - Х о д ж а е в а Н. А. 1970. Лямблиоз. Патогенез, клиника, лечение. Ташкент.
- З а л ь н о в а Н. С., И ш м у х а м е д о в А. И. 1966. Стеаторея при лямблиозе. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1 : 110.
- С о л о в ь е в М. М. 1967. Всасываемость липидов при экспериментальном лямблиозе. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 5 : 585—589.
- С о л о в ь е в М. М. 1968. Биология лямблий и взаимоотношения их с организмом хозяина (обзор литературы). Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 6 : 720—726.
- С о л о в ь е в М. М., А к и м о в а Р. Ф., Ш м а к о в а В. И. 1971. Выделение и поддержание культур *Lambliа duodenalis* на модифицированной среде Карапетяна. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1 : 75—78.

- Уголев А. М., Иезуитова Н. Н., Масевич Ц. Г., Надирова Г. Я., Тимофеева Н. М. 1969. Исследование пищеварительного аппарата у человека. «Наука», Л.: 216.
- Antia F. P., Desai H. G., Jeejeebhoy H. H., Kane M. P., Borakar A. V. 1966. Giardiasis in adults. Incidence, symptomatology and absorption studies. Indian J. med. sci., 20 (7): 471—477.
- Borgström B., Dahlqvist A., Lundh G., Sjövall J. J. 1957. Studies of intestinal digestion and absorption in the human. Clin. Invest. 36: 1521—1536.
- Holdberg D. M., Campbell R., Roy A. D. 1969. Studies on the binding of trypsin and chymotrypsin by human intestinal mucosa. Scand. J. Gastroent., 4: 217—226.
- Morecki R., Parker J. G. 1967. Ultrastructural studies of the human *Giardia lamblia* and subjacent jejunal mucosa in a subject with steatorrhea. Gastroenterology 52 (2): 151—164.
- Mueller J. C., Jones A. L., Brandborg L. L. 1973. Scanning electron microscope observation in human giardiasis. Scann. Electron microsc. Chicago, III: 557—563.
- Roux J., Ecalle R. 1968. Influence du suc pancréatique sur la prolifération in vitro du *Giardia duodenalis*. C. R. Acad., 266 (seric D): 2434—2436.
- Ruff M. D., Read C. P. 1973. Inhibition of pancreatic lipase by *Hymenolepis diminuta*. Parasitol., 59: 105—111.

STUDY OF FERMENTATIVE HYDROLYSIS OF FAT IN THE PRESENCE
OF *LAMBLIA DUODENALIS* (IN VITRO)

R. F. Akimova, I. I. Benediktov, M. M. Soloviev

S U M M A R Y

The influence of *Lambliа* on the hydrolysis of fat by lipase was studied in vitro. The hydrolysis rate of fat in the presence of live *Lambliа* and without them was determined colorimetrically by the quantity of the formed glycerine. In addition, the kinetics of this reaction was studied by the method of compensating potentiometry by neutralization of fat acids with alkali.

The intact organisms were found to cause an inhibition of fermentative hydrolysis of fat. The importance of this fact from the point of view of interaction in the host-parasite system is discussed.
