

УДК 576.895 : 122 : 597.5

О ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАЦЕРКАРИЙ РОДА DIPLOSTOMUM (TREMATODA, DIPLOSTOMIDAE)

Н. С. Окопный, И. Д. Тромбицкий

В экссудатах метацеркарий *Diplostomum spathaceum* обнаружена активность ферментов: пепсина, катепсина, гиалуронидазы, липазы, имеющих секреторное происхождение. Под воздействием гидролитических ферментов происходят значительные изменения биохимического состава хрусталика глаза рыб. Возможной причиной существенных нарушений в функционировании органов и тканей рыб при диплостомозе являются поступающие продукты гидролиза тканей хрусталика. На активность ферментов, выделяемых паразитами, существенное воздействие оказывает температура.

Ущерб, наносимый рыбоводству хронической формой диплостомозов, значителен и образуется в результате гибели пораженных рыб и в большей степени от снижения темпа их роста (Шигин, 1971, 1980). Очевидно, задержка роста рыб, вызываемая метацеркариями трематод рода *Diplostomum*, является следствием ослабления зрения пораженных рыб, что препятствует успешному поиску пищи, а также непосредственного влияния паразитов на организм хозяина. Механизм воздействия метацеркарий диплостомид на рыб еще не вполне понят. Известно, что они вызывают глубокие патологические изменения хрусталика и всего глаза рыбы (Шигин, 1969; Гревцева, 1977; Shariff e. a., 1980). Значительны нарушения, происходящие в органах и тканях рыб при заболевании (Кириченко, Косарева, 1975).

Несмотря на ряд исследований патогенеза диплостомоза, биохимические аспекты взаимоотношений паразита и хозяина изучены слабо. В частности, показано, что метацеркарии воздействуют на ткани хрусталика гиалуронидазой (Бауер и др., 1981). Многие авторы при изучении гистологических особенностей диплостомид указывают на наличие у них специализированных секреторных клеток (Гинецинская, 1968), а также присутствие в таких клетках различных ферментов (Краснодембский, 1972). Между тем биохимический подход при изучении системы паразит—хозяин представляется важным: с его помощью можно выявить наиболее уязвимые звенья, что могло бы послужить основой для разработки методов лечения болезни.

С целью изучения патогенеза диплостомоза, нами были исследованы ферментативная активность экссудатов (выделений) метацеркарий и влияние паразитов на метаболизм в пораженных тканях рыб.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследованы метацеркарии трематод рода *Diplostomum* различного возраста из хрусталиков глаз молоди, сеголеток и двухлеток белого толстолобика *Hypophthalmichthys molitrix*. Определение инвазионных метацеркарий по методике Шигина (1976) показало их принадлежность к *D. spathaceum* s. str.

Активность ферментов пепсина, катепсина, трипсина, липазы, нуклеаз и гиалуронидазы определяли по руководству Асатиани (1969) путем инкубирования соответствующих забуференных растворов с экссудатами или гомогенатами метацеркарий. В качестве ингибиторов протеаз применяли: для пепсина —

ионы свинца, для катепсина — иодацетат в концентрации 0.001 М. Ингибирование трипсина осуществляли трипсин-ингибитором из сои, липазы — гемоглобином.

Для выявления влияния температуры на активность ферментов *Diplostomum* опыты проводили с зараженными годовиками, термостатированными при температурах воды 3, 15 и 25° в течение 4 суток. Извлечение метацеркарий, их стерилизацию, получение экссудатов и гомогенатов осуществляли при указанных температурах в забуференных растворах. Термостатирование полученных ферментов с субстратами проводили при оптимальном значении рН растворов и при указанных температурах. Аналогично исследовали инвазионных метацеркарий от рыб, взятых при тех же температурах воды прудов в различные сезоны года. Белок определяли по методу Лоури (Lowry e. a., 1951).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проникновение и перемещение к месту обитания внутритканевых паразитов сопряжены с необходимостью преодоления различных тканей хозяина. Для церкарий *D. spathaceum* это прежде всего покровы тела рыбы, слой сетчатой оболочки глаза, кортикальный слой хрусталика. Церкарии лизируют ткани с помощью секретов желез проникновения (Гревцева, 1977). Для изучения механизмов, лежащих в основе взаимодействия метацеркарий с тканями хрусталика, выяснения участия в этом процессе ферментов, выделяемых паразитом, мы поставили опыты по определению активности ферментов, способных разрушать белковые, белково-липоидные и белково-углеводные структуры тканей. Такой подход определялся также необходимостью выяснения механизма питания диплостомид как внутритканевых паразитов.

Поскольку известно, что метацеркарии вызывают сложные изменения в пораженных тканях хрусталика, мы определяли также активность нуклеаз — РНК-азы и ДНК-азы, как возможных индукторов изменения метаболизма в пораженных тканях, ведущих к образованию бельма. Как следует из полученных данных (табл. 1), в экссудатах метацеркарий обнаружена активность некоторых ферментов, имеющих существенное значение для физиологических отравлений организма. Прежде всего это пепсин и катепсин — ферменты, способные расщеплять белковые субстраты тканей. Последнее важно как для объяснения механизмов перемещения паразитов в тканях хрусталика, так и для определения возможности использования продуктов гидролиза в качестве пищи.

На активную роль питания в системе паразит—хозяин при диплостомозе рыб указывает тот факт, что эндопептидазы гидролизуют как внутренние, так и внешние (концевые) пептидные связи, т. е. атакованный ферментом субстрат может быть разрушен полностью. О наличии гидролиза свидетельствуют приводимые ниже данные, а также материалы, полученные Гревцовой (1977), Шариффом и другими (1980), о глубоких морфологических изменениях тканей хрусталика глаза рыб при диплостомозах.

Принято считать, что протеолитические ферменты — катепсины — локализованы в основном в лизосомах (Покровский, Тутельян, 1976). Однако у внутритканевых паразитических нематод, в частности у паразита карпа *Philometroides lusiana* и у мермитид из насекомых, мы обнаружили активность катепсина в буферных растворах субстратов, в которые были добавлены экссудаты, полученные от этих паразитов (Окопный, 1981).

Механизм выделения катепсина нематодами и метацеркариями диплостомид можно объяснить функционированием специализированных секреторных клеток (Гинецинская, 1968; Краснодарский, 1972), а также тем, что функция катепсина сводится к гидролизу белковых компонентов тканей до пептидов различных размеров в отличительном интервале значений рН среды (4—6), тогда как пепсин активно действует лишь в очень кислой среде.

Наличие в экссудатах метацеркарий диплостомид пепсина и катепсина является следствием адаптации ферментного аппарата паразита к тканям хозяина.

В экссудатах метацеркарий обнаружены также гиалуронидаза, действующая на углеводный комплекс, и липаза, расщепляющая жиры. Следует отметить, что мы обнаруживали все ферменты у метацеркарий различного возраста (20 дней и более). Однако липаза была найдена только у инвазионных диплостомид в возрасте 100 дней и более. Это можно объяснить либо более поздним созреванием клеток, секретирующих липазу, либо тем, что паразит нуждается в липидах как наиболее энергоемком материале лишь в определенном возрасте.

Обнаруженная активность всех ферментов в экссудатах, за исключением катепсина, всегда была выше, чем в гомогенатах. Последнее указывает на их секреторное происхождение, так как известно, что в гомогенатах активность большинства ферментов возрастает. Субстратная специфичность, оптимум значения pH для действия ферментов, полное их ингибирование специфическими ингибиторами свидетельствуют о том, что мы имели дело именно с названными ферментами.

В экссудатах метацеркарий различного возраста трипсин и нуклеазы не были обнаружены, хотя в гомогенатах их активность значительна (табл. 1). Последнее указывает на их важную роль лишь во внутриклеточном метаболизме.

Паразитирование метацеркарий вызывает не только местные патологические изменения глаз рыб, но и организма в целом (снижение уровня гликогена, жира и аскорбиновой кислоты в печени, сдвиг лейкоцитарной формулы) (Кириченко, Косарева, 1975; Шигин, 1977). Механизмы такого воздействия еще не вполне ясны.

Нам представляется, что для выяснения путей непосредственного влияния диплостомид на рыбу белый толстолобик является наиболее удобным объектом исследования, поскольку система «паразит—хозяин» в этом случае является молодой в эволюционном плане и ее компоненты, видимо, еще не прошли взаимную адаптацию. Кроме того, толстолобик — планктонофаг, и зрение, очевидно, не играет решающей роли в поиске пищи. Следовательно, непосредственное

Таблица 1

Активность ферментов в экссудатах и гомогенатах метацеркарий *Diplostomum* (A — в единицах оптической плотности по расщепленному субстрату; липаза — в мкл 0.050 N раствора NaOH)

Фермент	Активность ферментов			
	в экссудатах		в гомогенатах	
	без ингибитора	с ингибитором	без ингибитора	с ингибитором
Пепсин	0.315	0.010	0.295	0.010
Трипсин	0	—	0.310	0.025
Катепсин	0.185	0.010	0.215	0.010
РНК-аза	0	—	0.180	0.010
ДНК-аза	0	—	0.290	0.010
Гиалуронидаза	0.225	0.010	0.180	0.010
Липаза	260	0.020	200	0.020

Таблица 2

Влияние температуры на активность ферментов метацеркарий *Diplostomum* (A — в единицах оптической плотности по расщепленному субстрату; липаза — в мкл 0.050 N раствора NaOH)

Фермент	Активность ферментов					
	экссудат (t b°)			гомогенат (t b°)		
	3	15	25	3	15	25
Пепсин	0.105	0.180	0.355	0.100	0.190	0.310
Катепсин	0.070	0.140	0.215	0.080	0.180	0.265
Трипсин	0	0	0	0.115	0.205	0.310
Гиалуронидаза	0.090	0.200	0.330	0.055	0.205	0.215
Липаза	205	245	290	110	135	215

воздействие паразита на организм хозяина в такой системе проявляется в наиболее чистом виде.

Вероятно, действие паразита на организм рыбы в целом объясняется влиянием аминокислот, образующихся в результате воздействия ферментов на ткани хрусталика и попадающих с током крови в другие органы и ткани хозяина, на протекающие в них биохимические процессы. В силу специфических свойств (высокой морфогенности, способности к образованию амидов, участия в выработке гормонов и др.) аминокислоты переносятся с током крови и могут оказывать влияние на некоторые метаболические процессы: индуцировать или ингибировать биосинтез гормонов и через последние воздействовать на обмен веществ и состав форменных элементов крови. Степень такого влияния зависит от различных факторов. Наиболее интересным является температурный фактор,

поскольку температура может определять интенсивность патогенного воздействия метацеркарий в разные сезоны года.

Мы провели опыты по изучению влияния температуры на активность ферментов метацеркарий. Результаты (табл. 2) показывают, что активность ферментов метацеркарий возросла с повышением температуры от 3 до 25° почти в три раза. Несколько слабее возрастала активность липазы, что, возможно, связано со спецификой ее действия. Сходные показатели были выявлены у инвазионных метацеркарий, выделенных из рыб, взятых непосредственно из прудов летом, осенью и зимой при тех же температурах воды.

Полученные данные позволяют предположить, что при повышенных температурах патогенное действие метацеркарий выражено сильнее, чем при такой же инвазии, но в условиях низких температур, например в период зимовки.

Выделение ферментов имеет важное значение не только для проникновения в ткани хозяина, но и для осуществления функций питания паразита. Опреде-

ление содержания белков и липидов в пораженной ткани хрусталиков (табл. 3) показало, что количество белка составляет лишь 30% от его содержания в здоровой ткани. Сомнительно, чтобы такое количество белка было полностью вынесено в кровь. Очевидно, можно утверждать, что основное количество гидролизующего диплостомидами белка утилизируется ими же в виде пищи. Незначительное уменьшение содержания липидов, вероятно, объясняется тем, что в тканях хрусталика жиры, являясь составной частью белково- и углеводно-липидных комплексов, с трудом поддаются разрушающему действию липазы.

Таким образом, показано, что формирование и становление системы паразит—хозяин при диплостомозе рыб осуществляется при активном воздействии паразитов посредством способности выделять в окружающую среду комплекс ферментов, обеспечивающих диплостомидам проникновение через ткани хозяина и питание за счет продуктов гидролиза тканей, где они локализируются. Утилизация продуктов гидролиза тканей, по-видимому, непосредственно связана с обменом веществ у диплостомид и обеспечением метацеркарий в этот период основных потребностей в пище.

На характер и силу патогенного воздействия *Diplostomum* на рыб влияют те факторы, которые связаны с активированием или ингибированием ферментов метацеркарий, в частности температура, наличие ионов ингибиторов и др.

Л и т е р а т у р а

- А с а т и а н и В. С. Ферментные методы анализа. М., Наука, 1969. 739 с.
- Б а у е р О. Н., М у с с е л и у с В. А., С т р е л к о в Ю. А. Болезни прудовых рыб. М., Легк. и пищ. пром-сть, 1981. 319 с.
- Г и н е ц и н с к а я Т. А. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. Л., Наука, 1968. 406 с.
- Г р е в ц е в а М. А. Изменение хрусталика глаза рыб при экспериментальном диплостомозе. — Паразитология, 1977, т. 11, вып. 3, с. 260—263.
- К и р и ч е н к о Л. М., К о с а р е в а Н. А. Патологические изменения в организме растительноядных рыб при хроническом диплостомозе. — В кн.: Экологическая и экспериментальная паразитология. Вып. 1. Л., 1975, с. 69—72.
- К р а с н о д е м б с к и й Е. Г. Железистые аппараты церкарий некоторых видов трематод. — Вест. ЛГУ, 1972, № 21, с. 21—30.
- О к о п н ы й Н. С. Активность протеолитических ферментов у эндопаразитических нематод и онтогенезе. — В кн.: Физиология и патология пищеварения. 3-й Билатеральный симпозиум СССР—ЧССР. Кишинев, 1981, с. 113.
- П о к р о в с к и й А. А., Т у т е л ь я н В. А. Лизосомы. М., Наука, 1976. 382 с.
- Ш и г и н А. А. О патогенном воздействии на хрусталик трематод рода *Diplostomum* при хронической форме диплостомоза. — В кн.: Проблемы паразитологии. (Тр. 6-й научн. конф. паразитол. УССР. Ч. 2). Киев, Наукова думка, 1969, с. 283—286.
- Ш и г и н А. А. О влиянии диплостомозной инвазии на темп роста сеголеток белого амура. — Тр. ГЕЛАН СССР, 1971, т. 22, с. 227—231.

Т а б л и ц а 3

Содержание белков и липидов в пораженных метацеркариями *Diplostomum* хрусталиков глаз толстолобиков (в % на сухое вещество)

Вариант	Белок	% к контролю	Липиды	% к контролю
Хрусталики пораженные	20.5	30	11.1	75
Хрусталики здоровые	68.4	100	14.8	100

- Ш и г и н А. А. Метациркаррии рода *Diplostomum* фауны СССР. — Паразитология, 1976, т. 10, вып. 4, с. 346—351.
- Ш и г и н А. А. Патогенез и клиническое проявление диплостомозов рыб. — В кн.: Новое в борьбе с инвазионными болезнями рыб в условиях промышленного рыбоводства. М., 1977, с. 117—118.
- Ш и г и н А. А. Трематоды рода *Diplostomum* в биоценозах форелевого хозяйства «Сходня». — Тр. ГЕЛАН СССР, 1980, т. 30, с. 140—200.
- Pr o t e i n m e a s u r e m e n t w i t h t h e F o l i n p h e n o l r e a g e n t (L o w r y O., R o s e n b r a n g h N., F a r r A., R a n d a u R.) — J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, N 1, p. 265—275.
- S h a r i f f M., R i c h a r d s R. H., S o m m e r v i l l e C. The histopathology of acute and chronic infectious of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson with eye flukes, *Diplostomum* spp. — J. Fish Diseases, 1980, vol. 3, N 6, p. 455—465.

Институт зоологии и физиологии
АН МССР, Молдавская научно-
исследовательская рыбохозяйственная станция,
Кишинев

Поступило 3 III 1983

ON MECHANISM OF PATHOGENESIS IN FISHES DURING THE INFECTION
WITH TREMATODES OF THE GENUS *DIPLOSTOMUM* (TREMATODA, DIPLOSTOMIDAE)

N. S. Okopny, I. D. Trombitsky

S U M M A R Y

Studies were conducted of the content of ferments with which metacercariae of trematodes of the genus *Diplostomum* affect the tissues of the host's crystalline lens. The following ferments were found in exudates of metacercariae: pepsin, cathepsin, hyaluronidase and lipase. Their activity depends to a great extent on temperature. Considerable changes in the biochemical content of crystalline lens infected with the parasites were found. The character and force of pathogenic effect of diplostomatids on fishes depend on the factors associated with activation and inhibition of ferments of metacercariae, temperature and the presence of ions-inhibitors in particular.
