

УДК 576.895.121 : 597.553.2+598.422.1 : 577.1

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ СПЕКТРОВ ЦЕСТОД И ИХ ХОЗЯЕВ МЕТОДАМИ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ И ДИСК-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Л. П. Смирнов, В. С. Сидоров

Исследованы белковые составы цитоплазматических экстрактов из двух видов цестод и печени их хозяев, относящихся к холоднокровной и теплокровной системам паразит-хозяин. Одна система отличалась от другой фракционным составом и количеством белковых зон с высокой электрофоретической подвижностью. Предполагается, что температура внутренних сред рыбы и птицы играет немаловажную роль в возникновении обнаруженных различий.

Все без исключения живые организмы, в том числе и гельминты, испытывают на себе влияние факторов среды, среди которых температура является одним из главных. Поэтому изучение вопроса о влиянии температуры на жизнедеятельность гельминтов, паразитирующих у холоднокровных и теплокровных позвоночных, представляет несомненный интерес, поскольку адаптация животных к различным температурным режимам является одной из важнейших приспособительных реакций у организмов, обитающих в различных экологических условиях (Шишова-Касаточкина, Леутская, 1979). Например, установлено, что степень ненасыщенности жирнокислотных спектров мембранных липидов животных коррелирует с температурой их внутренних сред (Крепс, 1979). Однако до настоящего времени остается неясным, как влияет температура хозяина на формирование белкового статуса гельминта. Фактически отсутствуют сведения о зависимости белковых спектров гельминтов от адаптированности к экто- или эндотермному хозяину (с точки зрения физиологии эти термины более правильные, чем термины пойкилотермный и гомойотермный — Хочачка, Сомеро, 1977).

В задачу настоящей работы входило сравнительное изучение цитоплазматических белков двух видов цестод и позвоночных, входящих в одну систему паразит—хозяин, с целью поиска различий в белковых составах, определяемых температурным режимом системы: эктотермная (гельминт—рыба, 10—15°) или эндотермная (гельминт—птица, 40°).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Белковые составы изучали у цестод из отряда Pseudophyllidea: *Eubothrium crassum* Bloch, 1779 (подотряд Bothriosephalata) и *Diphyllobothrium dendriticum* Nitsch, 1824 (подотряд Diphyllobothriata), а также печени хозяев — палии (*Salvelinus lepechini*) и клуши (*Larus fuscus*). Сбор материала производили в 1976—1980 гг. в озерах Карельской АССР.

Подготовка образцов, выделение цитоплазматических белков и их исследование методами гель-хроматографии и диск-электрофореза в полиакриламидном геле подробно описаны ранее (Смирнов, Немова, 1977; Смирнов, Сидоров, 1978; Смирнов, Сидоров, 1981). Полученные результаты обработаны статистически (Кокунин, 1975).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитоплазматические белки *E. crassum* разделяли методом гель-хроматографии на 6 фракций, печени палии — на 5 (рис. 1, А, В). Молекулярные массы фракций приведены в табл. 1. Их средние значения у гельминта и хозяина близки, но имеются и различия. У эуботриумов выявлена фракция III с молекулярной массой 72 800 дальтон, отсутствовавшая в печени рыбы. Молекуляр-

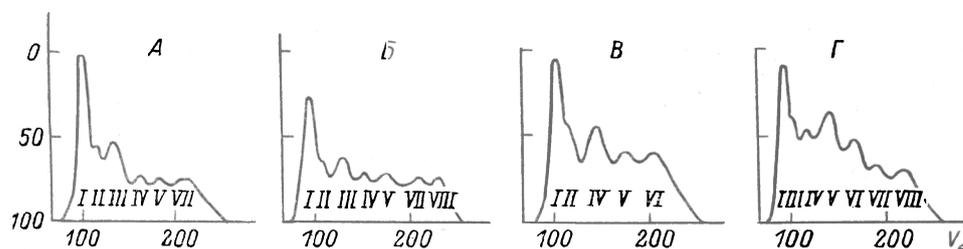


Рис. 1. Хроматограммы белкового экстракта *E. crassum*, печени палии (А, В) и *D. dendriticum*, печени клуши (Б, Г).

По оси ординат — T_{280} — пропускание при 280 нм; по оси абсцисс — V_e — объемы элюции фракций. Римские цифры — номера фракций.

ные массы фракций IV и V у *E. crassum* ниже соответствующих фракций печени палии.

При сравнении профилей хроматограмм *D. dendriticum* и печени клуши видно, что тканевые белки лентецов и печени чайки разделились на 7 фракций (рис. 1, Б, Г). В экстракте из дифиллоботриид обнаружена фракция с молекулярной массой 96 000 дальтон, отсутствовавшая в печени птицы, а фракция VI (25 700 дальтон) не выявлена у гельминта. В целом молекулярные массы белко-

Таблица 1

Молекулярные массы белковых фракций (в числителе, $M \pm m \times 10^3$) и относительно содержание белка во фракциях (в знаменателе, $M \pm m$, в % от общей суммы белков) цестод *E. crassum*, *D. dendriticum*, печени палии и клуши

Номер фракции	Экзотермная система		Эндотермная система	
	<i>E. crassum</i>	печень палии	<i>D. dendriticum</i>	печень клуши
I	110.0 и выше	110.0 и выше	110.0 и выше	110.0 и выше
	31.7 ± 1.8	23.6 ± 1.0	16.5 ± 2.0	14.5 ± 1.0
II	91.8 ± 1.0	96.0 ± 3.7	95.9 ± 1.3	—
	23.1 ± 1.0	30.0 ± 1.8	15.6 ± 1.9	—
III	72.8 ± 2.5	—	71.7 ± 1.0	80.4 ± 1.0
	20.0 ± 1.5	—	21.8 ± 1.1	26.1 ± 0.7
IV	53.6 ± 0.6	64.4 ± 0.7	51.6 ± 1.5	57.6 ± 0.7
	7.2 ± 0.8	24.3 ± 1.9	13.8 ± 0.7	23.2 ± 1.3
V	38.5 ± 1.5	45.5 ± 0.5	38.1 ± 1.6	42.2 ± 0.7
	8.1 ± 0.8	9.4 ± 1.6	11.4 ± 0.7	18.6 ± 1.1
VI	25.1 ± 1.3	27.5 ± 0.5	—	25.7 ± 0.8
	9.3 ± 1.0	12.7 ± 1.5	—	9.8 ± 0.3
VII	—	—	19.5 ± 1.8	16.8 ± 0.8
	—	—	11.8 ± 1.0	4.9 ± 0.9
VIII	—	—	13.7 ± 1.2	10.1 ± 0.4
	—	—	9.6 ± 0.4	3.1 ± 0.5
АГК	0.3	0.86	0.86	1.5

Примечание. АГК — альбумин-глобулиновый коэффициент (Шульман, Куликова, 1966).

вых фракций экстрактов из лентецов были ниже соответствующих фракций в печени хозяина. Только два последних пика на хроматограммах гельминта по своим молекулярным массам незначительно превышали таковые печени клуши.

Главное отличие по фракционному составу белкового экстракта *E. crassum* и печени палии (эктотермная система паразит—хозяин) от *D. dendriticum* и печени клуши (эндотермная система паразит—хозяин) состояло в том, что у птицы и ее гельминта найдены две низкомолекулярные фракции VII и VIII, отсутствовавшие у зуботриумов и рыбы.

Т а б л и ц а 2
Относительная электрофоретическая подвижность
цитоплазматических белков *E. crassum*,
D. dendriticum, печени палии и клуши

<i>E. crassum</i>	Печень палии	<i>D. dendriticum</i>	Печень клуши
0.03	0.09	0.07	0.01
0.05	0.10	0.15	0.04
0.07	0.13	0.17	0.06
0.11	0.17	0.22	0.08
0.15	0.21	0.29	0.09
0.18	0.23	0.31	0.11
0.20	0.27	0.33	0.13
0.23	0.30	0.45	0.16
0.26	0.35	0.45	0.20
0.30	0.37	0.47	0.27
0.35	0.40	0.52	0.33
0.39	0.42	0.55	0.36
0.44	0.45	0.60	0.39
0.52	0.50	0.64	0.42
0.58	0.53	0.68	0.43
0.62	0.56	0.73	0.48
0.69	0.58	0.75	0.50
0.79	0.63	0.79	0.51
0.89	0.65	0.82	0.55
	0.67	0.85	0.57
	0.68	0.89	0.60
		0.94	0.62
		0.98	0.65
			0.67
			0.69
			0.71
			0.73
			0.75

Примечание. Средняя квадратическая ошибка среднего арифметического (m) во всех случаях не превышала ± 0.005 .

Относительное содержание белка во фракциях у каждого из исследованных видов животных отличалось своеобразием, однако наблюдалась тенденция к увеличению доли белков с молекулярными массами ниже 70 000 дальтон от гельминта к хозяину (табл. 1). Соотношение между низкомолекулярными (ниже 70 000) и высокомолекулярными белками (свыше 70 000) — альбумин-глобулиновый коэффициент (Шульман, Куликова, 1966) в тканевых экстрактах *D. dendriticum* близок к печени палии и в 2.5 раза превышал таковой *E. crassum*.

Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле белки цитоплазматического экстракта *E. crassum* разделялись на 20 фракций, печени палии — на 22, из них 13 зон были сходны по электрофоретической подвижности (табл. 2). Учитывали не только полностью совпадающие по относительной подвижности компоненты, но и имевшие различия, которые не превышали 0.01. Девис и Линдсей (Davis, Lindsay, 1967) допускают разброс относительных подвижностей аналогичных зон в пределах ± 0.016 . Коэффициент сходства белковых полос (отношение числа полос с одинаковой подвижностью у паразитов или у пара-

зита и хозяина к общему числу полос на электрофореграмме) у эуботриумов составил 0.65, а в экстрактах из печени палии — 0.59.

Экстракт белков *D. dendriticum* разделился на 27 фракций, печени клуши — на 26. 12 полос совпадали по электрофоретической подвижности. Коэффициент сходства составил 0.44 и 0.46 соответственно, что ниже, чем у эуботриид и их хозяев. Обращает на себя внимание факт, что в экстрактах из дифиллоботриумов и печени клуши увеличивалось число полос в анодной половине геля, которые обозначены нами как быстромигрирующие компоненты (14 и 10), по сравнению с эуботриумами и печенью палии (6 и 7 соответственно).

Если провести сравнение между эктотермной и эндотермной системами паразит—хозяин по компонентам, имевшим одинаковую подвижность (рис. 2), то обнаружится, что число общих быстромигрирующих компонентов выше в системе гельминт—птица по сравнению с системой гельминт—рыба (7 и 4 соответственно).

ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе эволюции системы паразит—хозяин, представляющей собой антагонистический симбиоз двух организмов, происходит установление более тесных связей паразитов с хозяевами (Логачев, Семенов, 1969). Если гельминт приживается у данного хозяина, то он адаптируется не только к морфологии и экологии последнего; этот процесс охватывает также адаптацию метаболизма и биохимического статуса паразита к физиологическим, биохимическим, иммунологическим особенностям и обязательно к температуре хозяина как среды обитания.

Сравнительный анализ белковых экстрактов *E. crassum*, *D. dendriticum* и печени хозяев методом гель—хроматографии показал, что у эуботриумов и в печени палии отсутствовали низкомолекулярные фракции (19 500 и 13 700

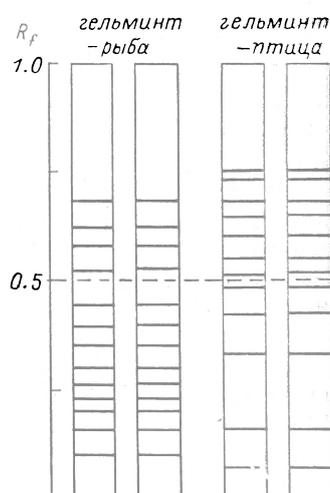


Рис. 2. Схемы электрофореграмм белков, имевших одинаковую относительную подвижность (R_f) у гельминта и хозяина. За единицу принята подвижность диска бромфенолового синего.

дальтон). Альбумин-глобулиновый коэффициент белковых экстрактов из *E. crassum* и печени палии был в 1.7—2.5 раза меньше, чем у *D. dendriticum* и в печени клуши.

Установлено, что по мере эволюционного усложнения в организме возрастает содержание низкомолекулярных белков (Благовещенский, 1966; Шулман, Куликова, 1966; Груздев и др., 1972; Смирнов, 1977). Однако факт более высокого содержания низкомолекулярных белков в тканях лентецов по сравнению с эуботриумами нельзя относить на счет различия в эволюционном положении этих видов цестод, поскольку они входят в состав одного отряда, также как нельзя ставить на одну ступень эволюционной лестницы *D. dendriticum* и палию по признаку равенства альбумин-глобулиновых коэффициентов белковых экстрактов из гельминта и печени рыбы.

Представляется вероятным, что наличие в эндотермной системе паразит—хозяин двух низкомолекулярных фракций, отсутствовавших в эктотермной системе и увеличение доли белков с молекулярными массами ниже 70 000 дальтон может быть связано не только с адаптацией гельминтов к хозяевам по принципу молекулярной мимикрии (Damian, 1964; Сопрунов и др., 1969; Сидоров и др., 1972), но и следствием больших различий в температурах внутренней среды хозяев (палия — 10—15°, клуша — 40°). Данные, приведенные в монографии Александрова (1975), подтверждают вероятность такого явления.

При сравнительном исследовании белков цестод и печени хозяев методом диск-электрофореза выяснено, что до 65% белковых зон в экстрактах из эуботриумов имели одинаковую подвижность с белками печени палии. Белки *D. dendriticum* проявили гораздо меньше сходства с белками печени клуши (44%). Видимо, в эволюционном аспекте система лентец—чайка моложе системы эуботриум—палия, поэтому адаптация дифиллоботриумов к своим хозяевам менее глубока, чем у эуботриумов. Эуботрииды являются одними из наиболее древних представителей отряда Pseudophyllidea и в своей эволюции сопряжены с предками первых костистых пресноводных рыб (Протасова, 1977), поэтому за столь длительный период их белковый состав в значительной степени сблизился с белками печени хозяина. Интересно отметить, что выживаемость имагинальных фаз гельминтов в хозяевах неодинакова. Если продолжительность жизни *E. crassum* может, по-видимому, доходить до года, то *D. dendriticum* завершает цикл в окончательном хозяине за 7—10 дней, максимально за 2 мес. (Фрезе, 1977).

Однако в белковых спектрах дифиллоботриумов и печени чайки выявлены общие черты, отличающие эндотермную систему паразит—хозяин от эктотермной, а именно: по числу быстромигрирующих компонентов, имевших одинаковую электрофоретическую подвижность у гельминта и хозяина. В теплокровной системе таких зон было 7, а в холоднокровной только 4. Увеличение числа быстромигрирующих компонентов в экстрактах цитоплазматических белков дифиллоботриумов и печени клуши по сравнению с таковыми эуботриумов и палии, на наш взгляд, связано с большими различиями в температурах внутренних сред птицы и рыбы, что косвенно подтверждается исследованием Болдуина и Хочачки (Baldwin, Hochachka, 1970).

Вероятно, в процессе адаптации паразитов к хозяевам, у гельминтов формируются биохимические механизмы становления белкового статуса в условиях высоких температур сред первого порядка, аналогичные таковым хозяев и выражающиеся, в частности, в увеличении доли низкомолекулярных белков и белков с высокой электрофоретической подвижностью. Наличие таких механизмов совершенно необходимо как одно из условий успешного паразитирования в теплокровных хозяевах.

Литература

- Александров В. Я. Клетки, макромолекулы и температура. М., Наука, 1975. 280 с.
- Благовещенский А. В. Биохимическая эволюция цветковых растений. М., Наука, 1966. 327 с.
- Груздев А. И., Сидоров В. С., Смирнов Ю. А. Применение метода диск-электрофореза в полиакриламидном геле для изучения сывороточных белков лососевых рыб. — В кн.: Лососевые (Salmonidae) Карелии. Вып. I. Петрозаводск, 1972, с. 125—133.
- Кокунин В. А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов. — Укр. биохим. журн., 1975, т. 47, № 6, с. 776—790.
- Крепс Е. М. Клеточные липиды и их роль в адаптации водных организмов к условиям существования. — В кн.: Физиология и биохимия морских и пресноводных животных. Л., Наука, 1979, с. 3—24.
- Логачев Е. Д., Семенов Ю. М. К вопросу о гистологических особенностях взаимоотношений в системе паразит—хозяин. — В кн.: 7-я Всес. конф. по природн. очаговости болезней и общим вопросам паразитологии животных. Тез. докл., подсекция гельминтол. Алма-Ата—Самарканд, 1969, с. 60—61.
- Протасова Е. Н. Ботриоцефалы — ленточные гельминты рыб. М., Наука, 1977. 511 с.
- Сидоров В. С., Высоцкая Р. У., Быховская-Павловская И. Е. Аминокислотный состав некоторых паразитических гельминтов рыб. — В кн.: Лососевые (Salmonidae) Карелии. Вып. I. Петрозаводск, 1972, с. 142—149.
- Смирнов Л. П. Гель-хроматография белков печени и мышц некоторых позвоночных животных. — В кн.: Сравнительная биохимия рыб и их гельминтов. Петрозаводск, 1977, с. 92—99.
- Смирнов Л. П., Немова Н. Н. Сравнительная оценка белковых спектров печени и мускулатуры рыб, птиц и млекопитающих, получаемых методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле. — В кн.: Сравнительная биохимия рыб и их гельминтов. Петрозаводск, 1977, с. 85—92.
- Смирнов Л. П., Сидоров В. С. Сравнительное изучение белковых составов цестоды *Eubothrium crassum* и некоторых органов ее хозяина — палии (*Salvelinus lepechini*) методом гель-хроматографии. — В кн.: Экологическая биохимия животных. Петрозаводск, 1978, с. 53—60.

- Смирнов Л. П., Сидоров В. С. Сравнительное изучение белковых составов цестод *Eubothrium crassum* и *Diphylobothrium dendriticum* методами гель-хроматографии и диск-электрофореза. — В кн.: Сравнительные аспекты биохимии рыб и некоторых других животных. Петрозаводск, 1981, с. 80—87.
- Сопрунов Ф. Ф., Кротов А. И., Полякова О. И., Ершов В. С., Шихобалова Н. П., Лейкина Е. С. Перспективы дальнейшего развития гельминтологической науки по физиологии и биохимии гельминтов, иммунитету и аллергии при гельминтозах. — В кн.: Матер. науч. конф. ВОГ. Ч. 2. М., Наука, 1969, с. 39—58.
- Фреze В. И. Лентецы Европы (экспериментальное изучение полиморфизма). — В кн.: Цестоды и трематоды (морфология, систематика и экология). Тр. ГЕЛАН, 1977, т. 27, с. 174—204.
- Хочачка П., Сомеро Д. Стратегия биохимической адаптации. М., Мир, 1977. 400 с.
- Шишова-Касаточкина О. А., Леутская З. К. Биохимические аспекты взаимоотношений гельминта и хозяина. М., Наука, 1979. 280 с.
- Шульман Г. Е., Куликова Н. И. О связи белкового состава сыворотки крови крупных таксономических категорий рыб с их филогенией и экологией. — Успехи соврем. биол., 1966, т. 62, вып. 1(4), с. 50—60.
- Baldwin J., Noshachka P. W. Functional significance of isoenzymes in thermal acclimation: acetylcholinesterase from trout brain. — *Biochem. J.*, 1970, vol. 116, p. 883—887.
- Damian R. T. Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. — *Amer. Nat.*, 1964, vol. 98, p. 129—149.
- Davis G. M., Lindsay G. K. Disk electrophoretic analysis of molluscan individuals and populations. — *Malacologia*, 1967, vol. 5, p. 311—334.

Институт биологии
Карельского филиала АН СССР

Поступила 13 VI 1983

COMPARATIVE STUDY OF PROTEIN SPECTRA OF CESTODES
AND THEIR HOSTS BY MEANS OF GEL CHROMATOGRAPHY
AND DISK ELECTROPHORESIS

L. P. Smirnov, V. S. Sidorov

SUMMARY

Protein spectra of two parasite-host systems were studied by means of gel chromatography and disk electrophoresis: ectothermic (*Eubothrium crassum* — *Salvelinus lepechini*) and endothermic (*Diphylobothrium dendriticum* — *Larus fuscus*). The level of low molecular proteins and proteins with high electrophoretic mobility in tissue extracts from *D. dendriticum* and liver of *L. fuscus* was higher than in extracts from *E. crassum* and liver of *S. lepechini*. These differences are, apparently, due to a great difference in temperature of hosts' internal media (fish — 10 to 15°C, bird — 40°C).
