

УДК 595.13 : 577.126.3

© 1991

## ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ ТРИХИНЕЛЛ

П. О. Рипатти, В. А. Бритов

Проведено сравнительное изучение состава жирных кислот липидов мышц крыс и развивающихся в них личинок *Trichinella spiralis* и *T. nativa*. Все изученные виды имеют практически одинаковый жирнокислотный состав как в качественном, так и в количественном отношении, только у морозостойкого вида *T. nativa* дополнительно обнаружены заметные количества (в сумме до 3.5 %) докозапента- и докозагексаеновых кислот (22:5 и 22:6). На основании сопоставления содержания индивидуальных жирных кислот и корреляционных отношений между ними в тканях хозяина и гельминта, а также изменениях в их соотношениях у личинок после промораживания сделано предположение о существенной роли элонгирующих и десатурирующих ферментов в формировании состава жирных кислот липидов трихинелл.

Паразитические организмы в биохимическом отношении отличаются от живущих свободно. Это связано не только с необходимостью адаптироваться к обитанию в среде тела хозяина, но и возможностью получать от последнего в готовом виде многие метаболиты, которые свободно живущие организмы должны синтезировать сами (Barrett, 1981). Отсюда следует, что у паразитов должны быть сильно развиты механизмы избирательного поглощения тех или иных веществ из окружающей среды. Такие механизмы весьма разнообразны, и возникновение их в каждом отдельном случае определялось совместной эволюцией сосуществующих видов. Всякое обобщение в этом отношении рискованно, всегда необходим конкретный биохимический анализ каждой пары паразит—хозяин. Число изученных гостальных систем пока еще невелико, к тому же эти исследования далеки от завершения, особенно в биохимическом аспекте. Полная картина взаимоотношений паразита и хозяина может быть выяснена лишь после всестороннего исследования процессов жизнедеятельности обоих организмов.

В настоящей работе мы провели сравнительное изучение состава жирных кислот общих липидов мышц крыс и развивающихся в них личинок трихинелл видов *Trichinella spiralis* Owen, 1835 и *T. nativa* Britov, Boev, 1972.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследуемых гельминтов культивировали длительное время в крысах в лабораторных условиях. Личинок трихинелл выделяли из мышц путем переваривания мышечной ткани в искусственном желудочном соке при температуре 39—40° в течение 4 ч, после чего их отмывали 10 раз физиологическим раствором и дистиллированной водой. Определение вида описано Бритовым (1982). Дополнительную проверку правильности идентификации видовой принадлежности выделенных гельминтов провел по нашей просьбе доктор Поцио (Рим, Италия). Он разработал метод изоферментного типирования по большому набору ферментных систем и выявил четыре различных зимодема, соответствующих известным видам трихинелл (Pozio, 1987). Посланные доктору Поцио 5 образ-

цов *T. nativa* оказались полностью идентичны другим изолятам этого вида из Северной Европы, Гренландии и Северной Америки.

Для изучения влияния низких температур часть тушки крысы выдерживали в морозильной камере при  $-8$  или  $-10^{\circ}$  в течение 4, 5 или 67 сут с последующим оттаиванием и извлечением червей описанным выше способом. Контролем служили личинки, выделенные из другой части той же тушки непосредственно после смерти крысы.

Отмытых живых личинок переносили в баночки из-под пенициллина и заливали 10 мл этилового или метилового спирта, образцы мышц крыс по 0.2—1 г фиксировали подобным же образом через 5 мин после смерти животных. Пробы хранили до проведения анализа от 2 до 15 недель, в течение которых они не изменялись заметным образом.

Суммарные липиды образцов экстрагировали смесью хлороформ—метанол (2 : 1) (Folch e. a., 1957) и подвергали прямому метанолизу для получения метиловых эфиров жирных кислот (Цыганов, 1971). Анализ состава смеси проводили методом газожидкостной хроматографии в стеклянных насадочных колонках, заполненных хромосорбом W-HP зернением 100—120 меш, содержащим 15 % полиэтиленгликольадипата или 15 % диэтиленгликольсукцината. Газ-носитель — гелий, температура термостата  $196^{\circ}$ . Идентификацию жирных кислот проводили их сравнением со стандартными кислотами, а также по совпадению вычисленных эквивалентных длин цепей молекул с табличными данными (Jamieson, Reid, 1969; Jamieson, 1975). Соотношения площадей пиков рассчитывали по методу Бартлетта и Айверсона (Bartlet, Iverson, 1966). Статистический анализ проводили на ЕС ЭВМ с помощью пакета прикладных программ «СТАТЕС-2» (Тийтс и др., 1986).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Жирнокислотные составы обоих исследованных видов трихинелл оказались практически одинаковыми и существенно отличающимися от спектра жирных кислот мышц хозяев (табл. 1). Поскольку генетически детерминированными являются прежде всего жирные кислоты фосфолипидов, полученный результат соответствует имеющимся сведениям о высокой доле фосфолипидов в суммарных липидах личинок трихинелл (Barrett, 1981). Невысокое содержание моноеновых кислот также согласуется с предположением о низком уровне запасных липидов, что связано с доступностью необходимых для энергетических и структурных нужд жирных кислот из окружающих тканей.

Второй особенностью жирнокислотного состава изучаемых гельминтов, также уже отмеченной в печати (Barrett, 1981), можно считать высокое содержание стеариновой кислоты 18 : 0, в три раза превышающее ее относительную концентрацию в мышцах хозяев. Основной жирной кислотой, синтезируемой всеми животными организмами *de novo* из активного ацетата, является пальмитиновая 16 : 0, из которой с помощью ферментативных механизмов элонгации и десатурации образуются другие более длинноцепочечные жирные кислоты. Высокий уровень стеариновой кислоты в трихинеллах может быть связан с эффективной реакцией элонгации пальмитата либо в самих личинках, либо в мышцах крыс с последующим избирательным ее поглощением паразитами, либо тем и другим в равной степени. Статистический корреляционный анализ содержания отдельных жирных кислот в мышцах крыс и обитающих в них гельминтах (7 пар данных) показал, что корреляция для стеарата отсутствует, но весьма высока для пальмитата ( $r=0.9$ ). Этот результат позволяет считать, что большую долю пальмитиновой кислоты личинки получают в готовом виде от хозяина и сами элонгируют ее до стеарата.

Корреляционный анализ соотношений между относительными содержаниями отдельных жирных кислот в трихинеллах (все образцы объединены в один

Т а б л и ц а 1

Относительное содержание основных жирных кислот личинок трихинелл и мышц крыс (в процентах от суммы)

Relative contents of main fatty acids in larvae of *Trichinella* and muscles of rats (in per cent of the sum)

Жирная кислота <sup>1</sup>	<i>T. spiralis</i> (N-6)	<i>T. nativa</i> (N-4)	Мышцы крыс (N-7)
14 : 0	1.8±0.1	1.9±0.2	1.1±0.2
16 : 0	13.3±1.8	10.3±0.7	22.9±1.7
16 : 1	1.4±0.4	0.8±0.1	6.3±1.4
18 : 0	23.7±1.2	22.5±0.3	7.5±1.1
18 : 1	16.1±1.3	14.6±0.8	26.9±3.2
18 : 2 (n-6)	4.5±0.6	5.0±1.0	23.6±3.3
20 : 3 (n-6)	2.7±1.9	0.7±0.1	0.7±0.2
20 : 4 (n-6)	15.9±2.2	16.6±0.7	6.4±1.1
22 : 4 (n-6)	12.9±1.3	16.6±0.4	0.2±0.2
22 : 5 (n-6)	0.1±0.1	1.1±0.6	0.1±0.1
22 : 5 (n-3)		0.2±0.1	0.5±0.2
22 : 6 (n-3)		0.7±0.3	2.1±0.9
Другие (сумма) <sup>2</sup>	7.6	9.0	1.7
Сумма:			
насыщенных	42.0±0.8	38.7±0.7	32.0±1.9
моноеновых	18.4±1.6	16.5±0.8	34.4±4.3
полиеновых	39.0±2.7	44.3±0.5	33.6±4.8

Примечание.<sup>1</sup> В обозначении жирной кислоты в виде  $n:l$  ( $n-m$ )  $n$  — число атомов углерода в молекуле,  $l$  — число двойных связей (все связи цис-разделены метиленовой группой), ( $n-m$ ) — положение последней двойной связи.<sup>2</sup> Сумма минорных компонентов жирных кислот трихинелл состоит из 14 : 1, 15 : 0, 15 : 1, 17 : 0, 17 : 1, 18 : 3 ( $n-6$ ), 18 : 3 ( $n-3$ ), 20 : 4 ( $n-3$ ), 20 : 5 ( $n-3$ ) и не идентифицированных нами соединений.

массив независимо от видовой принадлежности,  $n=13$ ) выявил тесную связь между концентрациями моноеновых кислот 16 : 1 и 18 : 1 и содержанием пальмитата (коэффициент корреляции 0.93 и 0.85 соответственно). Этот результат дает

Т а б л и ц а 2

Влияние промораживания при  $-10^\circ$  в течение 5 суток на содержание основных жирных кислот личинок *T. spiralis* (в процентах от суммы)<sup>1</sup>The effect of freezing at  $-10^\circ$  during 5 days on the contents of main fatty acids of *T. spiralis* larvae (in per cent of the sum)

Жирная кислота <sup>2</sup>	Контроль	Опыт
14 : 0	1.6±0.1	0.6±0.1
16 : 0	7.9±0.1	28.8±0.3
16 : 1	0.5±0.1	0.9±0.1
18 : 0	27.1±0.4	18.1±0.2
18 : 1	12.2±0.2	20.9±0.4
18 : 2 (n-6)	2.9±0.1	2.6±0.2
20 : 3 (n-6)	1.3±0.1	1.2±0.1
20 : 4 (n-6)	22.0±0.1	6.8±0.2
22 : 4 (n-6)	17.3±0.2	7.2±0.3
Сумма других	7.2	12.9
Сумма:		
насыщенных	41.3±0.4	57.2±0.5
моноеновых	13.8±0.3	23.8±0.5
полиеновых	44.9±0.3	19.0±0.2

Примечание.<sup>1</sup>  $M+m$  — среднее значение и средняя квадратичная ошибка анализа на 3 различных хроматографических колонках.  
<sup>2</sup> Обозначения жирных кислот и перечень минорных компонентов приведены в примечаниях к табл. 1.

основание считать, что ненасыщенные кислоты также в значительной степени образуются самими гельминтами.

Длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты, как правило, животными организмами синтезируются из поступающих извне других полиеновых кислот, главным образом линолевой 18 : 2 и линоленовой 18 : 3. В мышцах крыс в значительных количествах содержатся линолевая (23.6 %) и арахидоновая 20 : 4 (6.3 %) кислоты, у трихинелл набор полиеновых кислот богаче, причем основными являются арахидоновая (16.6 %) и докозатетраеновая 22 : 4 (15 %). Такие соотношения относительных концентраций согласуются с предположением о поглощении личинками незаменимых жирных кислот из мышц хозяина и последующем эффективном преобразовании их с помощью десатурирующих и элонгирующих ферментных систем. Суммарные относительные содержания жирных кислот семейства линолевой кислоты (n—6) в мышцах крыс и гельминтах коррелируют с  $r=0.82$ .

Изложенным представлениям не противоречат результаты экспериментов по изучению влияния отрицательных температур на жирнокислотный состав липидов трихинелл. Обнаруженные изменения были качественно одинаковы для обоих изучаемых видов, но степень их выражения колебалась в широких пределах в зависимости от видовой принадлежности личинок, температуры и длительности промораживания. Характер этих изменений виден в табл. 2, где приведены для иллюстрации результаты одного из опытов. Состав жирных кислот личинок трихинелл после выдерживания при низких температурах существенно приближается к жирнокислотному спектру мышц крыс. Это проявляется в более высоком общем содержании насыщенных и моноеновых кислот (главным образом пальмитиновой и олеиновой) и более низкой доле стеариновой и полиненасыщенных кислот, полном отсутствии цепей с 5- и 6-двойными связями. Такой характер изменений может быть объяснен, если допустить, что при понижении температуры спад активности элонгаз и десатураз гельминтов начинается раньше, чем прекращается абсорбция жирных кислот из тканей хозяев. Предположение не представляется нелогичным, поскольку при низких температурах изменяется проницаемость биологических мембран, и возможно возрастание неизбирательной диффузии веществ (Simon, 1981).

Одной из наиболее интригующих проблем в физиологии трихинелл является высокая выживаемость вида *T. nativa* после длительного промораживания ( $-12^{\circ}$  в мышцах животных выдерживают 1.5 года, тогда как личинки других видов трихинелл при такой температуре погибают за 1—2 недели). В этой связи представляет интерес тот факт, что в 3 (из 4 изученных) пробах личинок *T. nativa* (и только в них) были обнаружены высоконенасыщенные жирные кислоты 22 : 5 и 22 : 6. Эта особенность жирнокислотного спектра *T. nativa* была отмечена нами ранее (Рипатти, Бритов, 1985). Пока нет прямых доказательств того, что перечисленные жирные кислоты непосредственно обеспечивают холодостойкость гельминтов, однако имеются определенные основания считать, что докозапента- и докозагексаеновые кислоты должны способствовать выживанию организмов при резких перепадах температуры. Как показало изучение свойств длинноцепочечных жирнокислотных цепей с метиленразделенными двойными связями методом имитационного математического моделирования (Рабинович и др., 1985, 1986; Рабинович, Рипатти, 1990), такие молекулы обладают высокой степенью гибкости и очень слабой зависимостью своих линейных размеров от температуры. С другой стороны, такие цепи часто тесно связаны с молекулами некоторых ключевых ферментов (Блюдзин и др., 1986; Avelldano, 1988), образуя вокруг них микросреду, слабо чувствительную к температурным сдвигам и соответственно способствующую сохранению нативности белков в широких пределах изменений внешних условий. В частности, экспериментально подтверждена зависимость термостабильности родопсина сетчатки глаза животных от содержания остатков полиненасыщенных жирных кислот

в фосфолипидах, связанных с белком (Каган и др., 1978, 1985; Берман и др., 1981).

Возможно, что более высокая морозостойкость личинок *T. nativa* обусловлена, по крайней мере частично, лучшей защищенностью их мембранных ферментов длинноцепочечными полиеновыми ацилами. С другой стороны, логично допустить, что и белки у этого вида обладают более высокой холодоустойчивостью, что находит свое отражение в различиях изоферментных систем (Pozio, 1987).

#### Список литературы

- Берман А. Л., Суворов С. А., Парнова Р. Г., Грачева О. А., Рычкова М. П., Этингер Р. Н. Тепловая устойчивость родопсинов и опсинов теплокровных и холоднокровных позвоночных // Журн. эволюц. биохимии и физиол. 1981. Т. 17, № 6. С. 547—555.
- Блюдзин Ю. А., Осадчая Л. М., Болдырев А. А. Жирнокислотный состав суммарных липидов и фосфолипидов мембранных препаратов транспортных АТФаз // Биохимия. 1986. Т. 51, вып. 9. С. 1499—1505.
- Бритов В. А. Возбудители трихинеллеза. М.: Наука, 1982. 272 с.
- Каган В. Е., Крепс Е. М., Тюрин В. А. Роль липидов в термостабильности мембранных белков // V Всесоюз. биохим. съезд. Т. 1. М.: Наука, 1985. С. 230—231.
- Каган В. Е., Шуколюков С. А., Тюрин В. А., Шведова А. А., Новиков К. Н., Корчагин В. П., Галущенко И. В. // Stud. biophys. 1978, № 1. С. 51—58.
- Рабинович А. Л., Рипатти П. О. О конформационных свойствах и функциях докозагексаеновой кислоты // ДАН СССР. 1990. Т. 314, № 3. С. 752—756.
- Рабинович А. Л., Дашевский В. Г., Рипатти П. О. Изучение термодинамической гибкости макромолекул с двойными связями основной цепи. Континуум-модель // Высокомолекул. соед. А. 1986. Т. 28, № 8. С. 1697—1705.
- Рабинович А. Л., Рипатти П. О., Дашевский В. Г. Температурная зависимость конформационных характеристик природных полиненасыщенных углеводородных цепей // Биофизика. 1985. Т. 30, № 5. С. 802—806.
- Рипатти П. О., Бритов В. А. Видовые различия состава жирных кислот трихинелл // Матер. докл. к IV Всесоюз. конф. по проблеме трихинеллеза человека и животных. Ереван, 1985. С. 32—33.
- Тийтс Т., Вийкманн Э., Каролин М., Пукк К. СТАТЕС-2. Таллинн, 1986.
- Цыганов Э. Г. Метод прямого метилирования липидов после тонкослойной хроматографии без элюирования с силикагеля // Лаб. дело. 1971. № 8. С. 490—493.
- Aveliano M. I. Phospholipid species containing long and very long polyenoic fatty acids remain with rhodopsin after hexane extraction of photoreceptor membranes // Biochemistry. 1988. Vol. 27, N 4. P. 1229—1239.
- Barrett J. Biochemistry of parasitic helminths. I.; Basingstoke, 1981. 308 p.
- Bartlett J. C., Iverson J. L. Estimation of fatty acid composition by gas chromatography using peak heights and retention time // J. Assoc. Offic. Analyt. Chemists. 1966. Vol. 49, N 1. P. 21—27.
- Folch J., Lees M., Sloan Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues (for brain, liver and muscle) // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226. P. 497—509.
- Jamieson G. R. GLC-identification techniques for long-chain unsaturated fatty acids // J. Chromatogr. Sci. 1975. Vol. 13, N 10. P. 491—497.
- Jamieson G. R., Reid E. H. The analysis of oils and fats by gas chromatography. VIII. Correlation of retention data with polarity of stationary phase // J. Chromatogr. 1969. Vol. 42. P. 304—310.
- Pozio E. Isoenzymatic typing of 23 Trichinella isolates // Trop. Med. and Parasitol. 1987. Vol. 38, P. 111—116.
- Simon E. W. The low temperature limit for growth and germination // Effects of low temperatures on biological membranes, G. J. Morris and A. Clarke eds. London, 1981. 173—188.

Институт биологии  
Карельского НЦ АН СССР,  
Петрозаводск;  
Биолого-почвенный институт  
ДВНЦ СО АН СССР,  
Владивосток

Поступила 12.07.1989,  
после доработки 11.01.1991

## FATTY ACIDS OF TRICHINELLA

P. O. Ripatty, V. A. Britov

*Key words:* *Trichinella*, fatty acids, elongase, desaturase, polyunsaturated fatty acids, frost-resistance

### S U M M A R Y

The composition of fatty acids of lipids in the muscles of rats and larvae of *Trichinella spiralis* and *T. nativa* developing in them were studied. Both species are characterized by practically the same composition of fatty acids, only in the frost-resistant species *T. nativa* there was a sufficient amount (up to 3.5 %) of docosapenta- and docosahexaenic acids (22:5 and 22:6).

The comparison of the content of individual fatty acids in larvae and in muscles of the host by means of statistical correlation analysis suggests that larvae obtain a considerable portion of palmitic acid from the host and transform it into necessary long-chain saturated and unsaturated fatty acids by means of elongating and desaturating enzymes.

Changes in the contents of fatty acids in larvae extracted from dead rats, which during some days were undergone freezing at negative temperatures ( $-8 - 10^{\circ}$ ), are the same in quality for both species. These changes can be explained if we assume that the activity of elongases and desaturases of *Trichinella* decreases with cooling to a greater extent than the supply of palmitic acid from the host's tissues.

A higher frost-resistance of *T. nativa* may be associated as with a greater protection of enzymes in the membranes by long-chain polyene acyls so with a higher thermal stability of proteins themselves.

---