

ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ МЕМБРАН ЦЕСТОД *EUBOTHRIMUM CRASSUM* И *DIPHYLLOBOTHRIMUM DENDRITICUM*

Л. П. Смирнов, В. В. Богдан

Исследован жирнокислотный состав мембран лизосом и общих липидов двух видов цестод от холоднокровного и теплокровного позвоночных. Показано, что у *E. crassum* количественные различия между жирнокислотными спектрами мембран лизосом и общих липидов были незначительными, а у *D. dendriticum* обнаружена существенно более высокая степень насыщенности липидов мембран по сравнению с общими. Предполагается, что у паразитов, чей цикл развития связан со сменой хозяев, имеющих различную температуру тела, эволюционно возникли механизмы преадаптации жирнокислотных спектров липидов к термическим условиям среды, в которой гельминту предстоит развиваться.

Изучение жирных кислот у паразитов привлекает определенное внимание в связи с физиологическими функциями такими, как рост, размножение и защитные механизмы. Для млекопитающих и рыб установлено, что в осуществлении указанных функций важную роль играют лизосомы (Dingle, Fell, 1973). Ранее было показано, что у цестод существуют структуры, сходные по своим характеристикам с лизосомами позвоночных (Смирнов, Богдан, 1989). Спектр жирных кислот определяет многие свойства субклеточных структур, а количественное соотношение жирных кислот в нем зависит от температурного режима внутренней среды организма. В этом плане лизосомальная мембрана, препятствующая контакту лизосомальных ферментов с их клеточными субстратами, недостаточно изучена. Имеются единичные сведения о жирнокислотном составе мембран лизосом печени крыс (Покровский, Тутельян, 1976), фосфатидилхолинов лизосом печени некоторых рыб, амфибий, птиц (Сидоров, 1983). Каких-либо данных по спектрам жирных кислот в лизосомальной мембране у гельминтов в имеющейся литературе не найдено.

В задачу настоящего исследования входило сравнительное изучение качественного и количественного составов жирных кислот мембран лизосом и общих липидов цестод от холоднокровного и теплокровного хозяев.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования были взяты два вида цестод: *Eubothrium crassum* из пилорических придатков палии (*Salvelinus lepechini*) и *Diphyllobothrium dendriticum* из тонкого кишечника чаек. После отмывки от частиц химуса в физиологическом растворе гельминтов подсушивали, тщательно измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера—Эльвейэма с тефлоновым пестиком, используя в качестве суспендирующей среды 0.25 М раствор сахарозы (рН 7.2—7.4), содержащий 0.001 М ЭДТА. Фракцию, обогащенную лизосомами, получали методом дифференциального центрифугирования по Де Дюву (Покровский, Тутельян, 1976). Известно, что мембраны лизосом весьма гетеро-

генны по составу, поэтому для исследования использовали первичные лизосомы, происходящие только от мембран аппарата Гольджи, в отличие от вторичных лизосом, состав которых зависит от условий формирования (Покровский, Тутельян, 1976). Выделение первичных лизосом проводили методом равновесного центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (100 000 g, 2 ч). В процессе центрифугирования «легкая» лизосомальная субфракция, состоящая в основном из первичных лизосом, концентрировалась между слоями сахарозы с $\rho=1.09$ и $\rho=1.14$ (Смирнов, Богдан, 1980). Фракцию отбирали шприцем, разбавляли 0.25 М сахарозой и осаждали лизосомы при 105 000 g, 30 мин. Осадок подвергали 10-кратному замораживанию—оттаиванию для полного разрыва лизосомальных мембран, затем центрифугированием при 150 000 g, 30 мин осаждали мембранную фракцию, которую использовали для изучения жирнокислотного состава.

Липиды из мембран экстрагировали хлороформ-метанолом (2 : 1), затем методом прямой переэтерификации в абсолютном метаноле (Цыганов, 1971) выделяли из липидов метиловые эфиры жирных кислот, которые разделяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «Пай Юникам», модель 104 с пламенно-ионизационным детектором, на полярной фазе — 10%-ный полиэтиленгликольадипинат на диатомите С при 197°. Идентификацию жирных кислот проводили путем сравнения с известными метчиками, а также используя данные литературы (Берчфилд, Сторрс, 1964). Относительное содержание индивидуальных жирных кислот рассчитывали по площади под пиком (Берчфилд, Сторрс, 1964).

Аналогичным способом определяли жирнокислотный состав общих липидов гельминтов, фиксированных в хлороформ-метаноле (2 : 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В жирнокислотных спектрах мембран первичных лизосом *E. crassum* и *D. dendriticum* выявлено от 22 до 25 жирных кислот с числом углеродных атомов от 14 до 22. Установлено, что жирнокислотные спектры были качественно идентичны у обоих видов, за небольшим исключением: у лентецов отсутствовали гексадекадиеновая (16 : 2), эйкозапентаеновая (21 : 5) и докоза-тетраеновая (22 : 4) кислоты, содержание которых и у зуботриумов было незначительно. В мембранных липидах *E. crassum* преобладали пальмитиновая (16 : 0) — 15.4 %, олеиновая (18 : 1) — 15.2, эйкозапентаеновая (20 : 5 ω 3) — 8.6 и докозагексаеновая (22 : 6 ω 3) — 22.5 % кислоты. В липидах лизосом *D. dendriticum* доминирующими кислотами были 18 : 1 — 33.5 %, 16 : 0 — 19.7 и стеариновая (18 : 0) — 9.6 %.

Данные по индивидуальным жирным кислотам общих липидов этих цестод представлены ранее (Смирнов, Сидоров, 1979).

Жирнокислотные профили лизосомальных мембран *E. crassum* и *D. dendriticum* различались по количественному содержанию жирных кислот, распределенных на группы по степени насыщенности (табл. 1). Так, доля насыщенных кислот у зуботриумов была ниже, чем у лентецов в 1.3 раза, моноеновых — в 2.1, диеновых — в 1.6 раза. В то же время в лизосомах *E. crassum* обнаружено в 2.3 раза больше полиеновых длинноцепочечных кислот, в основном за счет 22 : 5 и 22 : 6.

Жирнокислотные составы мембран лизосом и общих липидов *E. crassum* количественно очень сходны, в то время как спектры жирных кислот мембран лизосом и общих липидов *D. dendriticum* имеют существенные различия. В мембранных липидах лентецов уровень насыщенных и триеновых кислот выше, чем в общих липидах, а уровень других групп кислот ниже.

Выявлено, что по коэффициенту ненасыщенности липидов, введенному Коссинсом и Проссером (Cossins, Prosser, 1978) и представляющему собой

Т а б л и ц а 1

Жирнокислотные спектры липидов мембран лизосом и общих липидов цестод
E. crassum и *D. dendriticum* (n=5)Fat-acidic spectra of lipids of lysosomal membranes and general lipids of
E. crassum and *D. dendriticum*

Жирные кислоты	<i>E. crassum</i>		<i>D. dendriticum</i>	
	мембранные	общие	мембранные	общие
Насыщенные	26.6±1.8	24.1±1.8	35.6±2.3	30.2±2.3
Моноеновые	16.7±0.9	18.5±0.6	35.5±2.2	24.4±1.4
Диеновые	3.6±0.2	3.8±0.2	5.9±0.3	9.3±0.2
Триеновые	3±0.3	3.8±0.2	2.6±0.3	2.2±0.1
Тетраеновые	12±0.4	13.2±0.6	7.6±0.6	16.8±0.5
Пента- и гексаеновые	38.3±1.4	36.2±1.2	13.1±1.1	18.9±0.7
Кислоты линоленового ряда	42.3±1.5	38.9±1.5	17.7±2	19.5±0.9
Коэффициент ненасыщенности	2.1	2.4	0.8	1.9

отношение суммы полиеновых кислот (от диеновых до гексаеновых) к сумме насыщенных, мембранные и общие липиды эуботриумов были близки, а липиды лизосом лентецов в 2.3 раза более насыщенны чем общие.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты указывают на существенные различия в жирнокислотных спектрах как общих, так и мембранных липидов *E. crassum* от холоднокровного (эктотермного) хозяина и *D. dendriticum* от теплокровного (эндотермного) хозяина. Какие факторы обуславливают эту разницу? Их несколько — это и генетический (видовая специфика), диета хозяина, но главный — термический режим среды обитания (температура хозяина) гельминтов. Именно под ее влиянием изменяются жирнокислотные составы всех мембранных структур клеток эктотермных организмов от синезеленых водорослей (Holton e. a., 1964), паразитических простейших (Beach e. a., 1982) до рыб (Крепс, 1981).

Наши данные однозначно свидетельствуют в пользу того, что термический режим среды обитания является доминирующим фактором, воздействующим на процессы формирования жирнокислотных спектров гельминтов. Это более высокий уровень общей ненасыщенности липидов, суммарной концентрации пента- и гексаеновых кислот, кислот линоленового ряда у паразита от эктотермного хозяина по сравнению с гельминтом от эндотермного. Более подробно этот факт обсуждался нами ранее при сравнительном исследовании общих липидов *E. crassum* и *D. dendriticum* (Смирнов, Сидоров, 1979; Сидоров, Смирнов, 1980). Известно, что изменение температуры влияет на жидкокристаллическое состояние мембраны клеток. Для компенсации дестабилизирующего действия включается адаптационный механизм, который при повышении температуры встраивает в липиды более насыщенные жирные кислоты, а при понижении — более ненасыщенные, таким образом, чтобы суммарная точка плавления липидов была несколько ниже той температуры, при которой в данный момент функционирует эктотермный организм (Крепс, 1981). Однако необходимо обратить внимание на данные, противоречащие этим рассуждениям. Если у *E. crassum* обнаружено почти полное сходство жирнокислотных спектров мембранных и общих липидов, то у *D. dendriticum* наблюдалась существенная разница между мембранными и общими липидами, заключающаяся в значительно более высоком уровне ненасыщенности последних. Другими исследователями также зарегистрирована высокая степень ненасыщенности липидов

Т а б л и ц а 2

Коэффициент насыщенности липидов личиночных и взрослых форм некоторых цестод

Unsaturation coefficient of lipids of larval and adult forms of some cestodes

Вид гельминта	Коэффициент ненасыщенности	Источник
<i>Diphyllobothrium vogeli</i> плероцеркоид	0.65	Сидоров, Смирнов, 1980
<i>Diphyllobothrium</i> sp. плероцеркоид	0.97	Nakagawa e. a., 1987
взрослая форма	1.3	
<i>Spirometra erinacei</i> плероцеркоид	0.85—0.97	Nakagawa e. a., 1987
взрослая форма (незрелые проглоттиды)	0.86—1.23	Fukushima e. a., 1988
взрослая форма (зрелые проглоттиды)	2.1	Тот же

у всех исследованных в этом аспекте цестод от теплокровных позвоночных (Barrett, 1981; Nakagawa e. a., 1987; Fukushima e. a., 1988). Обнаруженный феномен можно объяснить тем, что в процессе эволюции у цестод, цикл которых связан с последовательной сменой сред первого или второго порядков, резко различающихся по температуре, возникли механизмы преадаптации жирнокислотных спектров тех стадий паразитов, которые переходят из среды с низкой температурой в среду с высокой или наоборот, причем смена термических условий происходит скачком, например, плероцеркоид—имаго, имаго—яйца. Эту идею, на наш взгляд, подтверждают данные по коэффициентам ненасыщенности, приведенные в табл. 2.

Хорошо видно, что общие липиды плероцеркоидов от холоднокровных хозяев (рыба, змея) были более насыщенными, чем у взрослых форм, паразитирующих у теплокровных позвоночных. Кроме того, у исследованных гельминтов по мере роста и развития происходило количественное перераспределение жирных кислот, например, у *S. erinacei* концентрация стеариновой (18 : 0) кислоты снижалась от плероцеркоида к зрелым проглоттидам в 1.8, а олеиновой (18 : 2) — возрастала в 2.2 раза. Предполагается, что 18 : 2 кислота необходима для ускорения созревания репродуктивных органов у цестод (Nakagawa e. a., 1987).

Учитывая то обстоятельство, что тесная корреляция между жирнокислотными составами гельминта и окружающих тканей хозяина отсутствует вследствие обладания цестодами механизмов избирательного поглощения жирных кислот и элонгации углеводородного радикала кислоты, начиная с C₁₆ (многочисленные исследования, проведенные в этом аспекте, цитируются в работе Fukushima e. a., 1988), можно утверждать, что плероцеркоид аккумулирует в мембранных липидах кислоты в соотношениях, необходимых для создания высокого уровня насыщенности, чтобы начать рост и развитие сразу после перехода в среду с другим термическим режимом без периода длительной адаптации. Золотой рыбке, например, на акклиматизацию к температуре 38—40°, характерной для млекопитающих, требуется месяц при условии постепенного повышения температуры (Kniprgrath, Mead, 1968). Кроме того, высокое содержание насыщенных жирных кислот в мембранах плероцеркоида должно препятствовать активным физиологическим процессам, сохраняя в то же время обмен на уровне, достаточном для сохранения жизнеспособности в течение длительного времени в промежуточном хозяине. Аналогичным образом можно рассуждать относительно содержания ненасыщенных жирных кислот в общих липидах имагинальных стадий исследованных цестод, которое явно превышает

уровень, необходимый для нормальной жизнедеятельности гельминтов в теплокровных хозяевах. Надо думать, что метаболический поток жирных кислот, поглощенных паразитическим организмом из кишечника хозяина, распадается на две части; одна (более насыщенная) идет на построение мембранных структур клеток самого организма (лизосомы и другие органеллы), функционирующих при высокой температуре, другая — направляется на формирование липидов яиц, производимых гельминтом в огромных количествах, жирнокислотные спектры которых преадаптированы к будущему термическому режиму среды.

Список литературы

- Берчфилд Г., Сторрс Э. Газовая хроматография в биохимии. М.: Мир, 1964. 620 с.
 Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран. Л.: Наука, 1981. 339 с.
 Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. М.: Наука, 1976. 382 с.
 Сидоров В. С. Экологическая биохимия рыб. Л.: Наука, 1983. 240 с.
 Сидоров В. С., Смирнов Л. П. Жирнокислотный состав некоторых гельминтов холоднокровных и теплокровных позвоночных // Журн. эвол. биохим. и физиол. 1980. Т. 16, № 6. С. 551—555.
 Смирнов Л. П., Богдан В. В. Изучение белкового состава лизосом печени некоторых рыб методом гель-хроматографии // Биохимия пресноводных рыб Карелии. Петрозаводск, 1980. С. 81—86.
 Смирнов Л. П., Богдан В. В. Лизосомы цестод // Паразитология. 1989. Т. 23, вып. 3. С. 260—263.
 Смирнов Л. П., Сидоров В. С. Жирнокислотный состав цестод *Eubothrium crassum* и *Diphyllobothrium dendriticum* // Паразитология. 1979. Т. 13, вып. 5. С. 522—529.
 Цыганов Э. Г. Метод прямого метилирования липидов после тонкослойной хроматографии без элюирования с силикагеля // Лаб. дело. 1971. № 8. С. 490—493.
 Barrett J. Biochemistry of parasitic helminths. London; Macmillan, 1981. P. 19—41.
 Beach D. H., Holz G. G., Semper vivo L. H., Honigberg B. M. Temperature-dependent fatty acyl group changes in phospholipids of 37 °C—adapted *Leishmania donovani* promastigotes // J. Parasitol. 1982. Vol. 68. P. 1004—1009.
 Cossins A. R., Prosser C. L. Evolutionary adaptations of membranes to temperature // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. Vol. 75. P. 2040—2043.
 Dingle J. T., Fell H. B. Lysosomes in Biology and Pathology. XXIII. Amsterdam; London; N. Y., 1973. 543 P.
 Fukushima T., Abe K., Nakagawa A., Yamane Y. Fatty acid composition of plerocercoid and adult of *Spirometra erinacei* and the host-parasite relationship // Int. J. Parasitol. 1988. Vol. 18. P. 27—31.
 Holton R. W., Blecker H. H., Onore M. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of a bluegreen alga // Phytochem. 1964. Vol. 3. P. 595—602.
 Knipprath W. G., Mead J. F. The effect of the environmental temperature on the fatty acid composition and the in vivo incorporation of 1—C¹⁴ acetate in gold fish (*Carassius auratus* L.) // Lipids. 1968. Vol. 3. P. 121—128.
 Nakagawa A., Fukushima T., Fukumoto S. Fatty acid composition of *Diphyllobothrium* cestodes with reference to their hosts // Yonago Acta medica, 1987. Vol. 30. P. 65—80.

Институт биологии КФАН,
 Петрозаводск

Поступила 2.02.1990

FAT-ACIDIC CONTENT OF LYSOSOMAL MEMBRANES OF THE CESTODES EUBOTHRIUM
CRASSUM AND DIPHYLLOBOTHRIMUM DENDRITICUM

L. P. Smirnov, V. V. Bogdan

Key words: general lipids, fat acids, lysosomal membrane, *Eubothrium crassum*, *Diphyllobothrium dendriticum*, thermal condition

S U M M A R Y

Fat-acidic content of lysosomal membranes and general lipids in two species of cestodes from cold-blooded and warm-blooded vertebrates has been studied. It has been shown that in *Eubothrium crassum* quantitative differences between fat-acidic spectra of lysosomal membranes and general lipids are negligible and in *Diphyllobothrium dendriticum* the saturation degree of lipids of membranes is higher as compared to that of general ones. It can be expected that in parasites, whose developmental cycle is connected with a change of hosts that have different body temperature, there evolved preadaptive mechanisms of fat-acidic spectra of lipids to thermal conditions of the environment in which helminth has to develop.
