

## МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ АДАПТАЦИЯ ГЕЛЬМИНТОВ КИШЕЧНИКА РЫБ: ИНГИБИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К ПРОТЕАЗАМ У ЦЕСТОД *TRIAENOPHORUS NODULOSUS*

© 2023 г. Т. В. Фролова<sup>1,\*</sup>, Г. И. Извекова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок Ярославской обл., Россия

\*e-mail: [bianka28061981@gmail.com](mailto:bianka28061981@gmail.com)

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 28.06.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Исследована ингибирующая способность по отношению к протеазам экстрактов плероцеркоидов из печени окуня (*Perca fluviatilis* Linnaeus), а также экскреторно-секреторных продуктов и экстрактов незрелых и зрелых цестод *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781), из кишечника щуки (*Esox lucius* Linnaeus). Установлено, что ингибирующей способностью по отношению к протеазам в различной степени обладают экскреторно-секреторные продукты и экстракты как незрелых, так и зрелых цестод *T. nodulosus*. Достоверное снижение активности отмечено при действии исследуемых образцов на активность коммерческого трипсина. Большой ингибирующей способностью по сравнению с экскреторно-секреторными продуктами обладают экстракты червей. При этом экстракт незрелых червей ингибирует активность протеаз сильнее, чем таковой зрелых. В большей степени ингибирующая способность связана с экстрактом червей, лишенных щеточной каймы, чем с фракцией щеточной каймы тегумента.

**Ключевые слова:** рыбы, цестоды, протеолитическая активность

**DOI:** 10.31857/S0044452923050042, **EDN:** KNSOTT

### ВВЕДЕНИЕ

Ленточные черви (Cestoda) – плоские черви (Neodermata) обитают в организме различных позвоночных, при этом около 1000 видов паразитируют на пластиножаберных и почти 500 встречаются у взрослых костистых рыб. Они паразитируют в рыбах, как во взрослом состоянии, так и на личиночных стадиях, но лишь немногие взрослые ленточные черви действительно патогенны для рыб-хозяев [1].

Ленточные черви рода *Triaenophorus* – широко распространенные паразиты пресноводных рыб. Они отличаются сложным циклом развития, который протекает со сменой окончательного и двух промежуточных хозяев, обитающих в водной среде. Развитие процеркоидов происходит в полости тела первых промежуточных хозяев – веслоногих рачков отряда Copepoda. *Triaenophorus nodulosus* имеет широкий круг вторых промежуточных хозяев и встречается в рыбах, относящихся к 17 семействам [2]. Плероцеркоиды в большинстве случаев локализируются в печени. Некоторые виды *Triaenophorus* представляют серьезную опасность для рыб, в ряде случаев вызывая на стадии плероцеркоида массовые заболевания и даже гибель ценных промысловых рыб, главным образом в прудовых хозяйствах [1, 2]. В Рыбинском водохранилище, как и во многих других водоемах, основным вторым промежуточным хозяином *T. nodulosus* служит окунь

*Perca fluviatilis*, в печени которого развивается плероцеркоид. Окончательный хозяин *T. nodulosus* – щука *Esox lucius*, в ее кишечнике паразит завершает свое развитие. Полизоичные черви, попадающие в окончательного хозяина, быстро растут и развиваются. Сколекс и шейка цестод содержат ткани, из которых формируются новые проглоттиды, более молодые проглоттиды находятся в переднем отделе, в более старых происходит органогенез и в заднем отделе наступает половое созревание. Полностью созревшая стробила представляет собой возрастной градиент от молодых тканей в отделе шейки до стареющих тканей задних зрелых проглоттид [3].

Взаимодействие паразит-хозяин происходит посредством различных физиологически активных веществ, продуцируемых обоими партнерами. Способности гельминтов проникать, мигрировать и выживать внутри хозяина способствует ряд их экскреторных/секреторных белков [4]. Один из основных компонентов секреторных продуктов паразита – ингибиторы сериновых протеаз [5]. Они играют важную роль в выживании паразита за счет способности ингибировать ферменты хозяина и в норме присутствуют в микроокружении и/или секреторируются иммунными эффекторными клетками [6]. Эти ингибиторы регулируют активность протеаз и контролируют различные процессы, связанные с их активностью, в том числе защиту от

пищеварительных ферментов хозяина [6, 7]. По данным некоторых авторов белки – наиболее важная группа иммунорегуляторных веществ паразитов, к которым, в числе прочих, относятся и ингибиторы протеаз [8].

Ранее нами установлено, что зрелые черви *T. nodulosus* в кишечнике окончательного хозяина – щуки способны ингибировать протеолитические ферменты [9, 10]. Среда инкубации, в состав которой входят экскреторно-секреторные продукты цестод, и экстракт зрелых *T. nodulosus* большее влияние оказывают на активность трипсина по сравнению с протеолитической активностью слизистой оболочки кишечника хозяина [9].

В связи с этим целью настоящего исследования было попытаться выяснить, какие стадии зрелости червя *T. nodulosus* обладают способностью ингибировать протеазы, а также определить способность ингибировать протеолитическую активность фракциями щеточной каймы тегумента и экстракта червя, лишенного щеточной каймы тегумента.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Приготовление препаратов

Объектом исследований служили взрослые цестоды *Triaenophorus nodulosus*, обитающие в кишечнике щуки *Esox lucius* и плероцеркоиды из печени промежуточного хозяина – окуня *Perca fluviatilis* – из Рыбинского водохранилища. Для исследований отобрано 32 щуки длиной 38–65.5 см; 58 зараженных плероцеркоидами окуней длиной 16–24 см. Вскрытие извлеченных из щук кишечника и печени окуня, а также дальнейшее приготовление препаратов осуществляли на ледяной бане. Число червей в одной щуке колебалось от 1 до 20 экз.; плероцеркоидов в печени окуня, как правило, – по одному экземпляру. Взрослые черви различались по стадии зрелости и условно были разделены на “незрелых” и “зрелых”, содержащих гравидные проглотиды. Извлеченных из печени плероцеркоидов и из кишечника хозяина взрослых цестод 3 раза тщательно промывали в растворе Рингера для холоднокровных животных, рН 7.5 (6 г NaCl; 0.14 г KCl; 0.5 мл 10% CaCl<sub>2</sub>; 0.54 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.02 г KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.16 г MgSO<sub>4</sub> в 1 л дистиллированной воды) с целью удаления ферментов хозяина, адсорбированных на их поверхности. Масса плероцеркоидов, использованных в качестве одной пробы, колебалась от 0.27 до 0.64 г. Масса “незрелых” червей, использованных в качестве одной пробы, колебалась от 0.27 до 0.68 г, “зрелых” – от 0.4 до 1.67 г. Пять проб “зрелых” червей были использованы в опытах по разрушению щеточной каймы тегумента, методика которой описана ниже. Остальные шестьдесят проб “незрелых” и “зрелых” червей инкубировали в 2 мл раствора Рингера каждую в течение 24 ч. Все инкубации проводили при температуре 7°C с целью получения секреторных/экскреторных

продуктов цестод. В течение всего времени инкубации черви оставались живыми. Извлеченных и отмытых плероцеркоидов и взрослых червей после инкубации гомогенизировали с помощью гомогенизатора Ultra-Turrax T 10 basic (ИКА, Германия) и гомогенат разводили раствором Рингера в соотношении масса: объем 1: 4. Гомогенаты центрифугировали при 7500 g в течение 5 мин при 4°C, для дальнейших исследований использовали супернатант (экстракт червей). Среды инкубации и экстракты замораживали и хранили при –20°C. Таким образом, для дальнейших исследований было получено 5 проб экстрактов плероцеркоидов, по 6 проб сред инкубации и экстрактов “незрелых” и по 10 проб сред инкубации и экстрактов “зрелых” червей.

Для приготовления гомогената слизистой оболочки кишечника щук его вскрывали, удаляли хитин и скребком снимали слизистую оболочку, которую гомогенизировали и разводили раствором Рингера в соотношении масса : объем 1: 19. Гомогенаты центрифугировали при 7500 g в течение 5 мин при 4°C.

### Разрушение щеточной каймы тегумента

Для разрушения щеточной каймы тегумента был модифицирован метод дифференциального центрифугирования, предложенный для ее отделения у цестод *Hymenolepis diminuta* [11]. Каждую из 5 групп червей *T. nodulosus*, извлеченных из кишечника щук и трижды отмытых в растворе Рингера, помещали в 0.2% раствор Тритон X-100 в 0.2 М трис-НСl буфере, рН 7.4 в соотношении масса : объем 1 : 9 и инкубировали при 4°C в течение 10 мин. Затем пробирки встряхивали с помощью вортекса (V-1 plus, BioSan) в течение 60 сек. Червей извлекали из раствора детергента, который в дальнейшем использовали для получения фракции щеточной каймы тегумента. Для этого раствор детергента центрифугировали при 2500 g в течение 15 мин, супернатант еще раз центрифугировали при 20000 g в течение 90 мин, осадок для дальнейших исследований не использовали. Центрифугирование проводили при 4°C. Кроме того, из червей, лишенных щеточной каймы тегумента, готовили экстракт в соотношении масса : объем 1 : 9, как описано выше. Таким образом, для дальнейших исследований получали две фракции: (1) щеточная кайма тегумента (5 проб) и (2) тело червя, лишенного щеточной каймы (5 проб).

### Определение количества белка

В среде инкубации цестод, экстрактах червей и гомогенатах слизистой оболочки кишечника определяли концентрацию белка методом Бредфорда [12] при 595 нм на спектрофотометре SPECTROstar Nano (BMG LABTECH, Германия). Для построе-

ния калибровочной кривой использовали бычий сывороточный альбумин (ПанЭко).

#### *Определение активности ферментов*

Суммарную активность протеиназ в гомогенате слизистой оболочки кишечника рыб (активность трипсина КФ 3.4.21.4, химотрипсина КФ 3.4.21.1 и дипептидаз КФ 3.4.13.18) и активность коммерческого трипсина (MP Biomedicals, USA) определяли с использованием в качестве субстрата 0.3%-ного раствора азо-казеина в трис-НСI буфере, рН 7.5 [13, 14]. Субстрат и ферментативно активный препарат инкубировали 60 мин при 20–22°C. Реакцию останавливали добавлением 0.3 М раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), образовавшийся осадок из негидролизованного белка удаляли центрифугированием при 7500 g в течение 5 мин. Интенсивность развивающегося окрашивания, пропорционального активности ферментов, измеряли в супернатанте при 425 нм. Активность протеаз рассчитывали как разность показаний спектрофотометра для пробы с субстратом и холостой пробы для минутного интервала на г влажной массы (для общей протеолитической активности) или мг белка (для специфической активности).

Активность трипсина (КФ 3.4.21.4) определяли в течение 10 мин при 22°C, при 407 нм с использованием BAPNA (N- $\alpha$ -бензоил-dl-аргинин p-нитроанилид, PanReas-AppliChem) в качестве субстрата (0.1 mM раствор в DMSO – диметилсульфоксид) в 100 mM трис-НСI буфере с добавлением 150 mM NaCl и 20 mM CaCl<sub>2</sub>, рН 8.0. За единицу активности трипсина принимали 1 мкмоль субстрата, гидролизованного за 1 мин в 1 мл образца при 407 нм и температуре 20–22°C [15]. Активность химотрипсина (КФ 3.4.21.1) определяли в течение 10 мин при 22°C, при 256 нм с использованием ВТЕЕ (бензоил-тирозин-этил-эстер, Sigma-Aldrich) в качестве субстрата (1 mM раствор в 50%-ном метаноле) в 80 mM трис-НСI буфере с добавлением 100 mM CaCl<sub>2</sub>, рН 7.8. За единицу активности химотрипсина принимали 1 мкмоль субстрата, гидролизованного за 1 мин в 1 мл образца при 256 нм и температуре 20–22°C [16].

#### *Определение ингибирующей способности препаратов T. nodulosus*

В качестве источника ингибиторов протеолитической активности использовали среду инкубации, экстракт гельминтов и фракции, полученные при разрушении щеточной каймы тегумента. Для определения ингибиторной способности в опытную среду, содержащую 100 мкл гомогената слизистой оболочки кишечника щуки или 100 мкл раствора трипсина, добавляли 10 мкл инкубационной среды или экстракта червей и инкубировали в течение 15 мин при температуре 20–22°C. Одновременно в соответствующую контрольную пробу добавляли

аналогичный объем буфера. После этой инкубации в пробах определяли протеолитическую активность как описано выше. Для этой серии опытов использовали коммерческий препарат бычьего трипсина (HiMedia) в концентрации 0.1 мг/мл.

Расчеты ферментативной активности проводены двумя способами: на г влажной массы слизистой оболочки кишечника (общая ферментативная активность) и на мг белка (специфическая активность), содержащегося в г влажной массы слизистой оболочки кишечника или в мл раствора коммерческого препарата трипсина.

Все биохимические измерения проводили в трех повторностях.

#### *Статистическая обработка*

Результаты представлены в виде средних и их стандартных ошибок. Обработка результатов выполнена с помощью статистических пакетов “Microsoft Excel 2010” и STATISTICA 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Ингибиторный эффект оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Тьюки для множественного сравнения средних значений при  $p < 0.05$ .

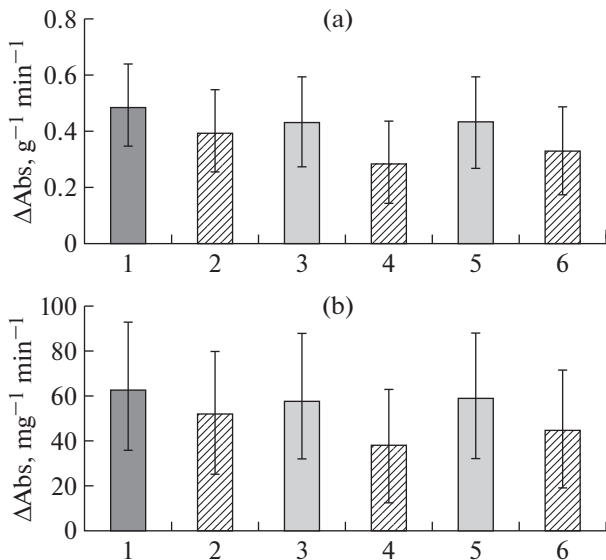
Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук (Протокол № 7 от 10 марта 2022 г.).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

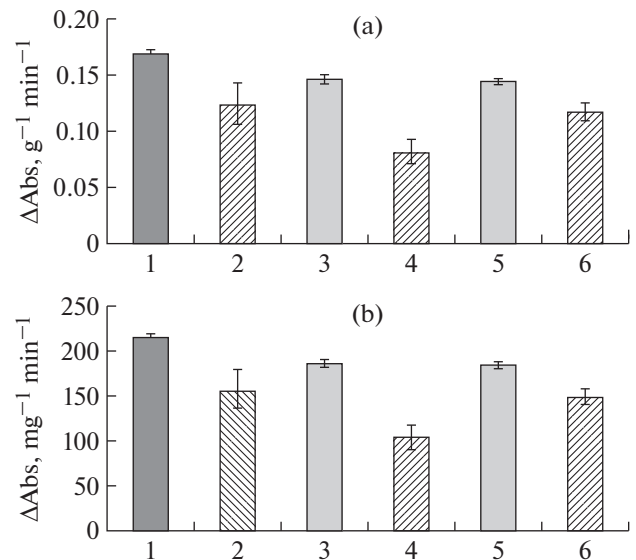
### *Влияние различных стадий зрелости цестод на активность протеолитических ферментов*

Ингибирующую способность процеркоидов в связи с их микроскопическими размерами доступными физиологическими методами не было возможности исследовать. Поэтому наши усилия были сосредоточены на изучении способности плероцеркоидов и различных стадий зрелости взрослых цестод *T. nodulosus* влиять на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника хозяина и коммерческий препарат трипсина. Показано, что на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника щуки исследованные препараты *T. nodulosus* достоверного влияния не оказывают,  $p > 0.05$ , хотя и отмечается тенденция снижения этой активности (рис. 1).

Однако при исследовании влияния этих препаратов на активность коммерческого трипсина (при попарном сравнении с контрольным значением) отмечено статистически значимое снижение его активности под действием всех использованных препаратов, кроме экстракта плероцеркоидов,  $p <$



**Рис. 1.** Влияние экскреторно-секреторных продуктов и экстрактов цестод *T. nodulosus* различных стадий зрелости на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника щуки. На (а): общая активность  $\Delta\text{Abs g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ; на (б): специфическая активность,  $\Delta\text{Abs mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . По горизонтали: 1 – контроль, 2 – экстракт плероцеркоидов, 3 – среда инкубации незрелых червей, 4 – экстракт незрелых червей, 5 – среда инкубации зрелых червей, 6 – экстракт зрелых червей. Представлены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка.



**Рис. 2.** Влияние экскреторно-секреторных продуктов и экстрактов цестод *T. nodulosus* различных стадий зрелости на общую и специфическую активность трипсина. На (а): общая активность  $\Delta\text{Abs g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ; на (б): специфическая активность,  $\Delta\text{Abs mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . По горизонтали: 1 – контроль, 2 – экстракт плероцеркоидов, 3 – среда инкубации незрелых червей, 4 – экстракт незрелых червей, 5 – среда инкубации зрелых червей, 6 – экстракт зрелых червей. Представлены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка.

$< 0.05$  (рис. 2). Следует отметить, что влияние экстрактов незрелых червей было достоверно больше по сравнению с другими исследованными препаратами ( $p < 0.05$ ). При этом активность трипсина уменьшается от  $12.7 \pm 1.5$  до  $52.2 \pm 5.5\%$  в зависимости от исследованного препарата. Зависимость сохраняется как при расчете общей, так и при расчете специфической активности. При этом наиболее сильное ингибирующее действие на активность трипсина оказывает экстракт незрелых червей ( $52.2 \pm 5.5\%$ ). Экстракты оказывают большее ингибирующее влияние на активность трипсина (на  $26.5 \pm 1.3\%$  для экстракта плероцеркоида и на  $52.2 \pm 5.5\%$  для экстракта незрелого червя), чем среды инкубации червей (на  $13.5 \pm 2.7\%$  для среды инкубации незрелого червя и на  $12.7 \pm 1.5\%$  для таковой зрелого).

*Влияние фракций щеточной каймы тегумента и экстракта тела червей, лишенных щеточной каймы, на активность протеолитических ферментов*

Мы предприняли попытку определить, щеточная кайма тегумента или тело червя, лишенное щеточной каймы, в большей степени обладают ингибирующей способностью по отношению к протеиназам. С этой целью щеточная кайма тегумента была разрушена, как описано в разделе “Методы исследования”. Способность ингибировать протеиназы была исследована у фракции щеточной каймы и у экстракта тела чер-

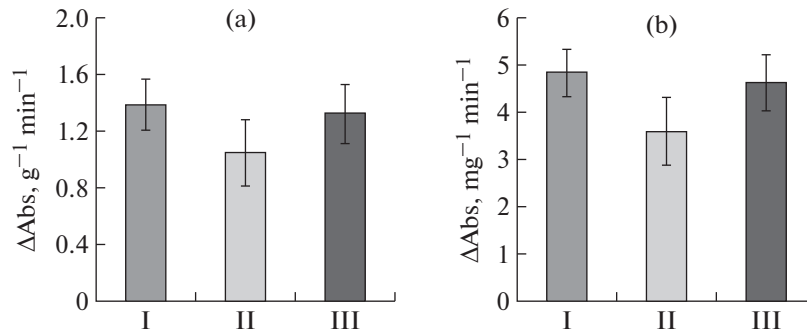
вя, лишенного щеточной каймы. Несмотря на тенденцию снижения протеолитической активности слизистой оболочки кишечника щуки под действием фракции червя, лишенного щеточной каймы тегумента, достоверного влияния исследованных фракций на общую и специфическую протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника хозяина – щуки не обнаружено  $p > 0.05$  (рис. 3).

Кроме того, было исследовано действие полученных фракций червей на активность трипсина и химотрипсина, функционирующих в слизистой оболочке кишечника щуки с использованием специфических для этих ферментов субстратов (рис. 4). Обнаружено, что фракция червя, лишенного щеточной каймы тегумента, достоверно снижала активность трипсина и химотрипсина в слизистой оболочке кишечника щуки (рис. 4).

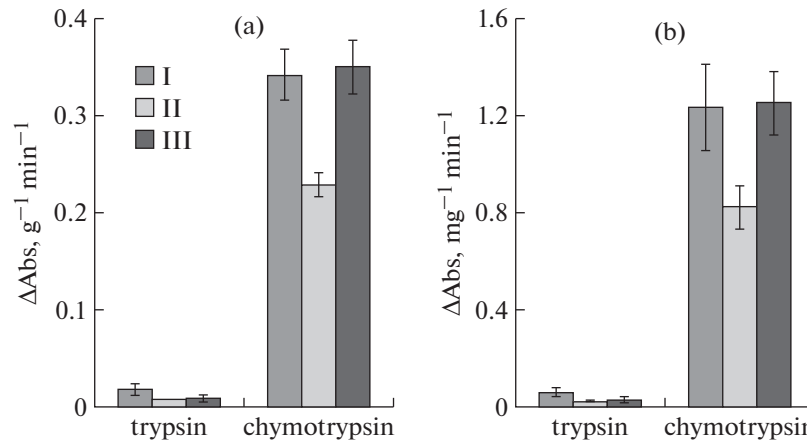
Также при действии на раствор коммерческого трипсина обе исследованные фракции достоверно снижали его активность  $p < 0.05$  (рис. 5). При этом активность трипсина под влиянием фракции червя, лишенного щеточной каймы, снижалась на  $58.4 \pm 4.9\%$ , а под влиянием фракции щеточной каймы тегумента – на  $17.8 \pm 2.6\%$ .

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Поскольку ранее мы установили, что взрослые черви в кишечнике окончательного хозяина способны ингибировать протеолитические ферменты



**Рис. 3.** Влияние различных фракций цестод *T. nodulosus* на протеолитическую активность слизистой оболочки кишечника щуки. На (а): общая активность  $\Delta\text{Abs g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ; на (б): специфическая активность,  $\Delta\text{Abs mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ . По горизонтали: I – контроль, II – экстракт червя, лишенного щеточной каймы тегумента, III – фракция щеточной каймы тегумента. Представлены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка.



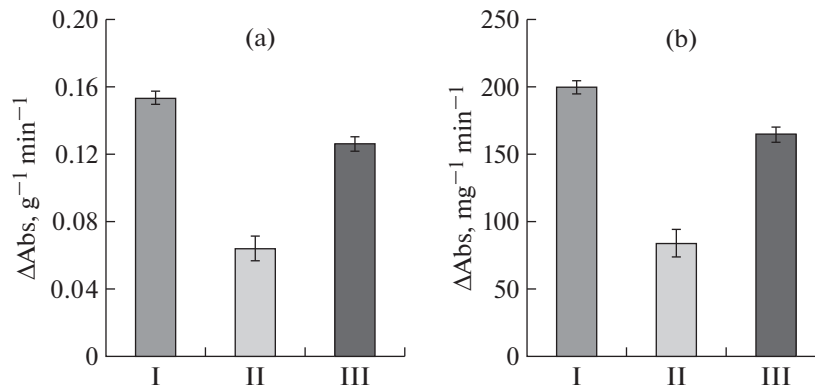
**Рис. 4.** Влияние различных фракций цестод *T. nodulosus* на активность трипсина и химотрипсина слизистой оболочки кишечника щуки. На (а): общая активность  $\Delta\text{Abs g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ; на (б): специфическая активность,  $\Delta\text{Abs mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ . I – контроль, II – экстракт червя, лишенного щеточной каймы тегумента, III – фракция щеточной каймы тегумента. Представлены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка.

[9, 10], встал вопрос о том, на какой стадии развития или зрелости червя у него проявляется эта способность. Стоит отметить, что ингибиторы сериновых протеаз – один из ключевых компонентов среди секреторных продуктов многих видов паразитов [17]. Они играют важную роль в выживании паразита за счет способности ингибировать ферменты хозяина и в норме присутствуют в микроокружении и/или секретируются иммунными эффекторными клетками [6]. Эти ингибиторы регулируют активность протеаз и контролируют разнообразные процессы, связанные с их активностью, в том числе они играют существенную роль в защите паразита от пищеварительных ферментов хозяина.

Не обнаружено достоверного влияния на протеолитическую активность экстрактов плероцеркоидов. Возможно, это связано с наличием у них капсулы, которая должна защищать червей от влияния хозяина. Плероцеркоиды локализируются в печени, где происходит инкапсуляция паразита путем разрастания соединительной ткани вокруг него. Образование капсулы – защитная реакция

хозяина на внедрение паразита. Плероцеркоиды в печени окуня могут жить не более двух лет. Отмечен разный уровень взаимной адаптации плероцеркоидов с хозяином в различных популяциях окуня, что определяется типом циркуляции гельминта в конкретных экосистемах [18]. Благодаря высокой активности стенок капсулы, образующейся вокруг паразита в печени хозяина, и обилию капилляров она играет роль полупроницаемой оболочки, которая, с одной стороны, обеспечивает благоприятные условия для питания, роста и развития паразита, с другой – надежно защищает от его воздействия ткани хозяина [2].

В то же время заражение плероцеркоидами влияет на жизнедеятельность хозяина – окуня. Так, показано, что у зараженных плероцеркоидами *T. nodulosus* сеголетков окуня активность протеолитических и гликолитических ферментов ниже, чем у незараженных, причем в переднем отделе кишечника активность пищеварительных гидролаз снижается особенно заметно. Снижение активности гидролаз может быть связано с нарушениями в функциониро-



**Рис. 5.** Влияние различных фракций цестод *T. nodulosus* на активность коммерческого трипсина. На (а): общая активность  $\Delta\text{Abs g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ; на (б): специфическая активность,  $\Delta\text{Abs mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ . По горизонтали: I – контроль, II – экстракт червя, лишённый щеточной каймы тегумента, III – фракция щеточной каймы тегумента. Представлены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка.

вании гепатопанкреаса у зараженных рыб и, как следствие, снижением синтеза и поступления зимогенов протеолитических ферментов и амилазы в кишечник [19]. Установлено, что заражение окуней старших возрастных групп плероцеркоидами *T. nodulosus* снижает активность ферментов, обеспечивающих начальные этапы ассимиляции белковых компонентов пищи у рыб. Показано снижение доли сериновых и металлопротеаз, а также значительное увеличение доли неидентифицированных протеаз в кишечнике зараженных рыб [20].

В настоящем исследовании установлено, что как незрелые, так и зрелые цестоды *T. nodulosus* обладают способностью ингибировать основной протеолитический фермент – трипсин. Большее влияние на активность трипсина экстракта незрелых червей по сравнению с таковым зрелых гельминтов может объясняться тем фактом, что первым для продолжения жизненного цикла предстоит дольше находиться в агрессивной среде хозяина – кишечнике. Зрелые черви готовы к дестробилизации и выходу яиц, возможно по этой причине способность их экстрактов ингибировать протеазы ниже, чем у незрелых червей. Полученные в настоящем исследовании данные согласуются с ранее установленным большим влиянием среды инкубации и экстракта зрелых *T. nodulosus* на активность трипсина по сравнению с протеолитической активностью слизистой оболочки кишечника хозяина [9]. Кроме того, установлено, что добавление экстрактов цестод *T. nodulosus* приводит к немедленному достоверному снижению активности раствора коммерческого препарата трипсина. Чем больше концентрация экстракта червей, тем больший эффект ингибирования он оказывает на активность трипсина. Наличие ингибиторов протеаз необходимо обитающим в кишечнике цестодам для защиты от постоянного воздействия протеолитических ферментов хозяина. Стоит отметить, что в транскриптом *T. nodulosus* были обнаружены различные молекулярные шапероны, протеолити-

ческие ферменты, ингибиторы протеаз (ингибиторы Кунитца-подобных протеаз, ингибиторы сериновых протеаз и серпинов) и антиоксидантных ферментов [21], что согласуется с полученными нами данными. Сравнение белкового состава плероцеркоидов и взрослых паразитов *T. crassus* и *T. nodulosus* показало значительное сходство протеомной организации *Triaenophorus* sp. во вторых промежуточных и конечных хозяевах [22], что также согласуется с полученными нами данными.

Кроме того, в экстрактах *T. nodulosus* выявлено два новых белка типа Кунитца, потенциально ответственных за ингибирующую способность ленточных червей по отношению к трипсину, что расширило список цестод, использующих белки типа Кунитца во взаимодействиях с хозяином [10]. Известно, что ингибиторы протеаз, в том числе семейство Кунитца, участвуют в процессах коагуляции, фибринолиза и воспалительного процесса и включают ингибиторы цистеиновой и аспаратил-протеаз [23]. По мнению этих авторов, ингибиторы протеазы типа Кунитца – единственные эндогенные ингибиторы воспалительного каскада. Благодаря этому ингибиторы протеаз паразитов способны действовать, регулируя различные физиологические механизмы хозяина. Эти ингибиторы вносят большой вклад в изучение воспалительных патологий. Инфекции ленточных червей влияют на иммунную систему хозяина на нескольких уровнях, и регуляторные эффекты паразита и его выделений могут не ограничиваться местами заражения. По этой причине возможность того, что специфические молекулы гельминтов обладают мощным модулирующим эффектом, может стать важным ресурсом для разработки будущих иммунотерапевтических средств для контроля воспалительных заболеваний [23].

Разрушение щеточной каймы тегумента при использовании описанного метода доказано для различных видов цестод [12, 24, 25]. В отличие от ингибирующей способности цестод *Eubothrium rugosum*, паразитирующих в кишечнике налима,

которая связана исключительно со щеточной каймой тегумента [24], аналогичная способность у *T. nodulosus* обнаружена как во фракции щеточной каймы, так и во фракции тела червя, лишённого щеточной каймы. То есть полученные нами данные свидетельствуют о различной локализации белков, ответственных за ингибирующую способность, у этих двух видов цестод.

Знание биохимии гельминтов позволяет выявить различные ферменты или метаболические пути, которые могут стать как мишенями для новых терапевтических средств, так и молекулярными маркерами для использования в диагностике [26]. Накопление сведений о спектре белков у различных гельминтов на разных стадиях развития показывает разнообразие этих белков [8, 27]. В экскреторно-секреторных продуктах метацисты *Taenia solium* обнаружено 76 белков [28]. Victor и соавт. предположили, что факт обнаружения у этих червей белков, участвующих в выживании паразитов, и описанных для других гельминтов, указывает на то, что экскреторно-секреторный протеом может не сильно различаться между видами или даже родственными родами. Кроме того, в числе обнаруженных белков отмечены белки, обладающие как эндопептидазной, так и ингибиторной по отношению к эндопептидазам активностями [28]. Накопленные к настоящему времени сведения свидетельствуют о необходимости расширения исследований в этом направлении, как за счет увеличения количества видов червей, так и за счет более глубокого изучения каждого из них. Возможно, это позволит найти общие закономерности или, наоборот, уникальность приспособлений каждого вида паразита к существованию в организме хозяина.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что ингибирующей способностью по отношению к протеазам в различной степени обладают среды инкубации, т.е. экскреторно-секреторные продукты, и экстракты как незрелых, так и зрелых цестод *T. nodulosus*. Достоверное снижение активности отмечено при действии исследуемых образцов на активность коммерческого трипсина. Большой ингибирующей способностью обладает экстракт червей, при этом экстракт незрелых червей ингибирует активность протеаз сильнее, чем экстракт зрелых. При разрушении щеточной каймы тегумента показано, что ингибирующая способность в большей степени связана с фракцией экстракта червей, лишённых щеточной каймы, чем со щеточной каймой тегумента.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-24-00248).

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Разработка концепции и дизайна работы (Т.В.Ф., Г.И.И.). Получение, анализ и интерпретация данных (Т.В.Ф., Г.И.И.). Участие в написании и редактировании статьи (Т.В.Ф., Г.И.И.).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scholz T, Kuchta R, Oros M (2021) Tapeworms as pathogens of fish: A review. *Journal of Fish Diseases*. 44: 1883–1900. <https://doi.org/10.1111/jfd.13526>
2. Kuperman BI (1981) Tapeworms of the genus *Trienophorus*, parasites of fishes. New Delhi: Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd.
3. Pappas PW, Narcisi EM, Rentko V (1983) Alteration in brush border membrane proteins and membrane-bound enzymes of the tapeworm *Hymenolepis diminuta* during development in the definitive host. *Mol Bioch Parasitol* 8: 317–323.
4. Cwiklinski K, Dalton JP (2018) Advances in *Fasciola hepatica* research using ‘omics’ technologies. *Int J Parasitol* 48: 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.12.001>
5. Zhang Y, Guo J, He L, Zong H-Y, Cai G-B (2018) Isolation and characterization of a novel serine protease inhibitor, SjsPI, from *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int* 67:415–424. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2018.04.002>
6. Zang X, Maizels RM (2001) Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *TRENDS Biochem Sci* 26: 191–197.
7. Morris SR, Sakanari JA (1994) Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*. *J Biol Chem* 269: 27650–27656. <https://doi.org/10.1134/S1062359020040081>
8. Kutyrev IA, Mazur OE, Goreva OB, Mordvinov VA (2020) A study of protein fractional composition during incubation of *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda) plerocercoids in a medium containing blood serum of the host, the baikal omul *Coregonus migratorius* (Coregonidae). *Biol Bull* 47: 490–496. <https://doi.org/10.1134/S1062359020040081>
9. Izvekova GI, Frolova TV, Izvekov EI (2017) Adsorption and inactivation of proteolytic enzymes by *Trienophorus nodulosus* (Cestoda). *Helminthologia* 54: 3–10. <https://doi.org/10.1515/helm-2017-0001>
10. Rogozhin E, Solovyev M, Frolova T, Izvekova G (2019) Isolation and partial structural characterization of new Kunitz-type trypsin inhibitors from the pike cestode *Trienophorus nodulosus*. *Mol Biochem Parasitol* 233: 111217. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111217>
11. Oaks J, Knowles W, Cain G (1977) A simple method of obtaining an enriched fraction of tegumental brush border from *Hymenolepis diminuta*. *J Parasitol* 63: 476–485.
12. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing

- the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem* 72: 248–254.
13. Alarcón, FJ, Martínez TF, Barranco P, Cabello T, Díaz M, Moyano FJ (2002) Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). *Insect Biochem Mol Biol* 32: 265–274.
  14. Nolasco-Soria H (2021) Improving and standardizing protocols for alkaline protease quantification in fish. *Rev Aquacult* 13: 43–65. <https://doi.org/10.1111/raq.12463>
  15. Holm H, Hanssen LE, Krogdahl A, Florholmen J (1988) High and low inhibitor soybean meals affect human duodenal proteinase activity differently: *in vivo* comparison with bovine serum albumin. *J Nutrit* 118: 515–520.
  16. Worthington Biochemical Corporation, 1991. *Worthington Enzyme Manual: Enzymes, Enzyme Reagents*. Freehold, N.J.
  17. Zimic MJ, Infantes J, López C, Velásquez J, Farfán M, Pajuelo M, Sheen P, Verastegui M, Gonzalez A, García HH, Gilman RH (2007) Comparison of the peptidase activity in the oncosphere excretory/secretory products of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *J Parasitol* 93: 727–734.
  18. Проница СВ, Пронин НМ (1988) Взаимоотношения в системах гельминты–рыбы. М.: Наука. [Pronina SV, Pronin NM (1988) Relationships in helminth–fish systems. М. Nauka (in Russ)].
  19. Izvekova GI, Tyutin AV (2014) Activity of digestive enzymes and distribution of the trematode *Bunodera luciopercae* (Muller) in the intestine of juvenile perch infected with plerocercoids of *Triaenophorus nodulosus* (Pallas). *Inland Water Biol* 7:167–171. <https://doi.org/10.1134/S1995082914010076>
  20. Frolova TF, Parshukov AN, Izvekova GI (2018) Activity of digestive enzymes in perch infected with *Triaenophorus nodulosus* (Pallas) plerocercoids. *Inland Water Biol* 11:501–506. <https://doi.org/10.1134/S1995082918040053>
  21. Kochneva A, Drozdova P, Borvinskaya E (2020). The first transcriptomic resource for the flatworm *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda: Bothriocephalidea), a common parasite of holarctic freshwater fish. *Marine Genomics* 51: 100702. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.100702>
  22. Borvinskaya E, Kochneva A, Bedulina D, Sukhovskaya I, Smirnov L, Babkina I (2021) Comparative Analysis of Proteins of Functionally Different Body Parts of the Fish Parasites *Triaenophorus nodulosus* and *Triaenophorus crassus*. *Acta Parasitol* 66: 1137–1150. <https://doi.org/10.1007/s11686-021-00384-6>
  23. de Magalhaes MTQ, Mambelli FS, Santos BPO, Morais SB, Oliveira SC (2018) Serine protease inhibitors containing a Kunitz domain: their role in modulation of host inflammatory responses and parasite survival. *Microb Infect* 20: 606–609. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.003>
  24. Izvekova GI, Frolova TV, Izvekov EI, Kashinskaya EN, Solovyev MM (2021) Localization of the proteinase inhibitor activity in the fish cestode *Eubothrium rugosum*. *J Fish Dis* 44: 1951–1958. <https://doi.org/10.1111/jfd.13508>
  25. Kashinskaya EN, Simonov EP, Poddubnaya LG, Vlasenko PG, Shokurova AV, Parshukov AN, Andreev KB, Solovyev MM (2023) Trophic diversification and parasitic invasion as ecological niche modulators for gut microbiota of whitefish. *Front Microbiol* 14: 1090899. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1090899>
  26. Lombardo JF, Pórfido JL, Sisti MS, Giorello AN, Rodríguez S, Córscico B, Franchini GR (2022) Function of lipid binding proteins of parasitic helminths: still a long road. *Parasitol Res* 121: 1117–1129. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07463-1>
  27. Xu J, Wu L, Sun Y, Wei Y, Zheng L, Zhang J, Pang Z, Yang Y, Lu Y (2020) Proteomics and bioinformatics analysis of *Fasciola hepatica* somatic proteome in different growth phases. *Parasitol Res* 119: 2837–2850. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06833-x>
  28. Victor B, Kanobana K, Gabriël S, Polman K, Deckers N, Dorny P, Deelder AM, Palmblad M (2012) Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion-secretion proteins. *Proteomics* 11: 1860–1869.

## METABOLIC ADAPTATION OF FISH INTESTINAL HELMINTHS: INHIBITORY ABILITY TOWARDS PROTEASES IN CESTODES *TRIAENOPHORUS NODULOSUS*

T. V. Frolova<sup>a, #</sup>, and G. I. Izvekova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Yaroslavl Region, Borok, Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: bianka28061981@gmail.com*

The inhibitory ability towards proteases was studied in the extracts of plerocercoids from the liver of perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus), as well as in the excretory-secretory products and extracts of mature and immature cestodes *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) from the intestine of pike (*Esox lucius* Linnaeus). It was found that excretory-secretory products and extracts of both mature and immature *T. nodulosus* display varying degrees of inhibitory ability against proteases. A significant decrease in activity was noted under the action of the studied samples on the activity of commercial trypsin. Tapeworm extracts exhibit a greater inhibitory ability compared to excretory-secretory products. At the same time, the extract of immature worms inhibits the activity of proteases more strongly than that of mature ones. The inhibitory ability is more closely associated with the extract of worms lacking the brush border than with the tegumental brush border fraction.

*Keywords:* fish, cestodes, proteolytic activity