

УДК 598.2:576.895.1+591.111.1

ВЛИЯНИЕ ЦЕСТОД, ПАРАЗИТИРУЮЩИХ В ТОНКОМ КИШЕЧНИКЕ ПТЕНЦОВ СЕРЕБРИСТОЙ ЧАЙКИ, НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАЗ ХОЗЯИНА

© 2024 г. М. М. Куikliна*, В. В. Куikliн

Мурманский морской биологический институт РАН,

Владимирская, 17, Мурманск, 183010 Россия

*e-mail: MM_Kuklina@mail.ru

Поступила в редакцию 14.03.2024 г.

После доработки 12.04.2024 г.

Принята к публикации 15.04.2024 г.

Определены **общая активность протеаз и активность подклассов протеаз в тонком кишечнике птенцов серебристой чайки *Larus argentatus* (Pontoppidan, 1763) при инвазии цестодами *Tetrabothrius erostris* (Loennberg, 1889) (Cestoda: Tetrabothriidae), *Microsomacanthus ductilis* (Linton, 1927) (Cestoda: Hymenolepididae), *Wardium cirrosa* (Krabbe, 1869) (Cestoda: Aploparaksidae), *Arctotaenia tetrabothrioides* (Loennberg, 1890) и *Alcataenia larina* (Krabbe, 1869) (Cestoda: Dilepididae)**. В тонком кишечнике чаек в местах с наибольшим скоплением ленточных червей (*M. ductilis* в проксимальном фрагменте, *W. cirrosa* в дистальном фрагменте, *A. tetrabothrioides*, *T. erostris* и *A. larina* в медиальном фрагменте) снижалась активность сериновых протеаз. При инвазии *M. ductilis*, *W. cirrosa* и *A. larina* активность цистеиновых протеаз в участках локализации цестод повышалась. Установлено, что все исследованные цестоды адсорбировали на поверхности тегумента ферменты гидролиза белков, большую часть из которых составляли сериновые протеазы. Показано, что гомогенаты цестод *W. cirrosa*, *M. ductilis*, *A. tetrabothrioides*, *T. erostris* и *A. larina* ингибировали активность протеаз хозяина и коммерческого трипсина.

Ключевые слова: цестоды, серебристая чайка, сериновые протеазы, трипсин, ингибиторы протеаз

DOI: 10.31857/S0031184724040021, **EDN:** BOANMV

Согласно современным данным, в тонком кишечнике серебристых чаек *Larus argentatus* (Pontoppidan, 1763), гнездящихся на Мурманском побережье Баренцева моря, обнаружено 10 видов цестод из четырех семейств (Dilepididae, Hymenolepididae, Tetrabothriidae и Aploparaksidae) (Куikliн, Кисова, 2007; Куikliн, Куikliна, 2021).

Гельминтофауна взрослых чаек насчитывает 9 видов ленточных червей, нелетающих птенцов – 6 видов (Kuklin, Kuklina, 2021). Цестоды *Tetrabothrius erostris* (Loennberg, 1889) (Cestoda: Tetrabothriidae), *Microsomacanthus ductilus* (Linton, 1927) (Cestoda: Hymenolepididae), *Alcataenia larina* (Krabbe, 1869) (Cestoda: Dilepididae), *Wardium cirrosa* (Krabbe, 1869) и *W. fryei* (Mayhew, 1925) (Cestoda: Aploparaksidae) паразитируют как у взрослых особей, так и у птенцов. Ленточные черви *Arctotaenia tetrabothrioides* (Loennberg, 1890) (Cestoda: Dilepididae), у которых в качестве облигатного окончательного хозяина выступают кулики (Спаская, Спасский, 1978), паразитировали в тонком кишечнике только у птенцов серебристой чайки (Kuklin, Kuklina, 2021). Сделано предположение, что обнаруженные различия связаны с кормовыми предпочтениями взрослых птиц и птенцов, а также с низкой резистентностью молодых птиц к инвазии неспецифичными гельминтами.

При использовании методов биохимического анализа изучали влияние инвазии ленточными червями на показатели обмена веществ серебристых чаек для оценки их физиологического состояния (Куклина, 2015; Kuklina, Kuklin, 2006). Установлено, что у серебристых чаек (как у взрослых особей, так и у птенцов) при инвазиях цестодами *T. erostris* и *M. ductilus* увеличивалась интенсивность белкового и углеводного обменов и активизировались процессы работы иммунной системы (Куклина, 2015; Kuklina, Kuklin, 2006). Отмечено, что наиболее выраженные нарушения в обмене веществ серебристых чаек, независимо от их возраста, зарегистрированы при высокой интенсивности инвазии указанными видами цестод. Выявленные изменения биохимических показателей могут свидетельствовать о недостатке питания птиц (снижение концентрации триглицеридов), потреблении пищи с низким содержанием белка (снижение концентрации магния) и конкурентных взаимоотношениях гельминтов с хозяином за питательные вещества.

Цестоды используют позвоночных животных в качестве окончательного хозяина и завершают свое развитие в желудочно-кишечном тракте. В последнее время активно проводятся работы по изучению влияния ленточных червей на пищеварительную активность рыб и морских птиц (Куклина, Куклин, 2017; Izvekova, Solovyev, 2016; Kuklina, Kuklin, 2018; Frolova, Izvekova, 2022). Установлено, что заражение цестодами вызывает изменения в активности пищеварительных ферментов, главным образом активности ферментов гидролиза белков – протеаз. Увеличение протеолитической активности наблюдалось в кишечнике у серебристых чаек *L. argentatus* при инвазии *W. cirrosa* и у моевок *Rissa tridactyla* (Linnaeus, 1758) при заражении *A. larina*, в кишечнике щуки *Esox lucius* (Linnaeus, 1758) при заражении *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) (Куклина, Куклин, 2017; Izvekova, Solovyev, 2016; Kuklina, Kuklin, 2018). Снижение активности протеаз в слизистой оболочке кишечника зарегистрировано

у мювки и серебристой чайки в местах локализации *T. erostris*, а также при инвазии *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) и *Eubothrium rugosum* (Batch, 1786) леща *Abramis brama* (Linnaeus, 1758) и налима *Lota lota* (Linnaeus, 1758), соответственно (Izvekova, Solovyev, 2016; Kuklina, Kuklin, 2016a, 2018; Frolova et al., 2019). Более того, установлено, что общее снижение активности протеаз происходит прежде всего за счет уменьшения активности сериновых протеаз (трипсина и химотрипсина) (Izvekova, Solovyev, 2016; Frolova et al., 2019). Авторы подчеркивали, что независимо от изменений активности протеаз (повышение или понижение их активности в кишечнике хозяина) важная составляющая влияния цестод – способность ингибировать активность протеаз хозяев и активность коммерческого трипсина (Frolova, Izvekova, 2022). Так, установлено, что экскреторно-секреторные продукты и экстракты цестод *T. nodulosus* из кишечника щуки ингибируют активность протеаз (трипсина и химотрипсина) (Frolova, Izvekova, 2022). Авторы отметили, что наиболее высокой ингибирующей активностью обладают экстракты неполовозрелых червей.

Целью работы стало изучение влияния некоторых видов цестод на пищеварительную систему серебристых чаек. Для достижения поставленной цели проведена оценка влияния цестод *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina*, *M. ductilis* и *W. cirrosa* на активность протеаз слизистой оболочки тонкого кишечника птенцов серебристой чайки. Выявлены способности цестод адсорбировать на поверхности тегумента протеазы и ингибировать их активность.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объект исследования

Материалом для представленного исследования стали птенцы серебристой чайки *L. argentatus* ($n = 23$). Птиц отлавливали в районе островов Гавриловского архипелага Мурманского побережья Баренцева моря (Кандалакшский государственный природный заповедник) в июле 2010, 2015 и 2018 гг.

Птиц усыпляли хлороформом, вскрывали, вырезали желудочно-кишечный тракт и отделяли тонкий кишечник. Тонкий кишечник делили на три фрагмента: проксимальный, медиальный и дистальный. Каждый фрагмент тонкого кишечника вскрывали вдоль, раскрывали и извлекали гельминтов, которых использовали для анализов и экспериментов. Слизистую оболочку тонкого кишечника птиц снимали скребком для биохимического анализа.

Определение способности цестод адсорбировать на поверхности тегумента протеазы хозяина

Для определения способности цестод адсорбировать на поверхности тегумента протеазы хозяина использовали метод последовательной десорбции (Кузьмина, 1976). Цестод, извлеченных из тонкого кишечника серебристых чаек, помещали в 5 мл раствора Рингера для

теплокровных животных (0.9% р-р NaCl, 1.15% р-р KCl, 1.22% р-р CaCl₂, 2.11% р-р KН₂ РO₄, 3.8% MgSO₄, 0.1 М фосфатный буфер, рН 7.4 в 1 л дистиллированной воды) и встряхивали на ротаторе Multi Bio RS-24 (Латвия) в течение 30 с, получая фракцию Д₁. Затем цестод переносили в 5 мл раствора Рингера для теплокровных животных и встряхивали на ротаторе в течение 15 мин, получая фракцию Д₂. Аналогичным образом получены последующие фракции Д₃ и Д₄. Фракции Д₁, Д₂, Д₃ и Д₄ замораживали для последующего биохимического анализа. Цестод использовали для паразитологического анализа, а их гомогенаты – для экспериментального исследования.

Паразитологический анализ

Систематический статус обнаруженных гельминтов устанавливали с использованием определителей и сводок (Спасская, Спасский, 1978; Темирова, Скрыбин, 1978; Бондаренко, Контримавичус, 2006; Ryzhikov et al., 1985). Обнаружены и идентифицированы цестоды: *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina*, *M. ductilus* и *W. cirrosa* (табл. 1). Производили подсчет паразитов и рассчитывали значения средней интенсивности инвазии (СИИ) для каждого фрагмента тонкого кишечника.

Таблица 1. Морфологические особенности цестод
Table 1. Morphological features of cestodes

Вид цестод	Морфологические особенности			Источник
	Длина стробилы, мм	Размеры сколекса, мм	Прикрепительный аппарат	
<i>Arctotaenia tetrabothrioides</i>	20–270	Длина 0.191, ширина 0.312	4 присоски (0.14–0.15 мм)	Спасская, Спасский, 1978; наши данные
<i>Tetrabothrius erostris</i>	23–250	Длина 0.26–0.49, ширина 0.28–0.6	4 ботридии (0.25×0.12 мм)	Темирова, Скрыбин, 1978; Ryzhikov et al., 1985
<i>Alcataenia larina</i>	20–100	Ширина 0.33–0.5	4 присоски (0.14–0.2×0.18–0.22 мм) и 20–23 крючьев длиной 0.096–0.118 мм	Ryzhikov et al., 1985; наши данные
<i>Microsomacanthus ductilus</i>	15–25	Ширина 0.18–0.24	4 присоски (диаметр 0.1–0.12 мм) и хоботок с 10 крючьями диорхоидного типа длиной 0.034–0.04 мм	Ryzhikov et al., 1985
<i>Wardium cirrosa</i>	100–180	Ширина 0.18–0.21	4 присоски (0.075–0.075) и хоботок с 10 крючьями аплопараксоидного типа длиной 0.022–0.024 мм	Бондаренко, Контримавичус, 2006; наши данные

Приготовление проб для определения ингибиторной активности цестод

После проведения процедуры последовательной десорбции, описанной выше, цестод еще трижды отмывали раствором Рингера для теплокровных животных, взвешивали и гомогенизировали в этом же растворе для теплокровных животных в соотношении массы к объему 1 : 10. Гомогенаты центрифугировали при 9000 об/мин в течение 5 мин при 4°C на центрифуге Centurion Scientific CR4000R (Britain). **Надосадочную жидкость разливали по пробиркам, замораживали и использовали для ингибирования активности протеаз.**

Приготовление проб для определения активности протеаз

Навеску слизистой оболочки тонкого кишечника серебристых чашек взвешивали и гомогенизировали в 0.05 М трис-HCl буфере pH 7.5 в соотношении массы к объему 1 : 20. Полученные гомогенаты центрифугировали при 9000 об/мин в течение 5 мин при 4°C на центрифуге Centurion Scientific CR4000R (Britain). Надосадочную жидкость сливали в пробирки, замораживали и использовали для биохимических исследований.

Определение активности протеаз

Общую активность протеаз (трипсин КФ 3.4.21.4, химотрипсин КФ 3.4.21.1 и дипептидазы КФ 3.4.12.18) определяли с использованием 0.3% раствора азоказеина (Sigma, USA) в качестве субстрата, приготовленного на 0.05 М трис-HCl буфере pH 7.5 (Alarcón et al., 2002). К 0.5 мл гомогената слизистой оболочки добавляли 1.0 мл 0.3% раствора азоказеина. Смесь инкубировали при 40°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 1.0 мл 0.3М ТХУ (трихлоруксусная кислота). Затем центрифугировали при 9000 об/мин в течение 5 мин при +4°C на центрифуге Centurion Scientific CR4000R (Britain). **Оптическую плотность супернатанта** измеряли в кювете толщиной 1 см при длине волны 440 нм на спектрофотометре Jenway 6305 un/vis (Britain).

Параллельно с анализом общей активности протеаз проводили реакции для определения подклассов протеаз (Alarcón et al., 2002). Использовали ингибиторы: 100 мМ PMSF (фенилметил-сульфонил-флуорид) (Sigma, USA), растворенный в DMSO (диметилсульфоксид) (Sigma, USA), – ингибитор сериновых протеаз; 0.5 М ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) (Sigma, USA), **растворенный в 1 М NaOH, – ингибитор металлопротеаз; 1 мМ E-64, растворенный в дистиллированной воде (Sigma, USA), – ингибитор цистеиновых протеаз.** К 0.5 мл гомогената слизистой оболочки тонкого кишечника добавляли 50 мкл определенного ингибитора, перемешивали и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем проводили измерения протеолитической активности с использованием 0.3% раствора азоказеина, как описано выше (Alarcón et al., 2002).

Активность протеаз представлена в условных единицах (усл. ед.) (значения оптической плотности на 1 г влажной массы ткани слизистой оболочки тонкого кишечника за 1 час). Рассчитано соотношение (%) подклассов протеаз.

Общую активность протеаз и подклассов протеаз измеряли в гомогенатах слизистой оболочки тонкого кишечника птиц и во фракциях D_1 , D_2 , D_3 и D_4 . Общую активность протеаз

определяли при исследовании способности цестод ингибировать активность протеаз в слизистой оболочке тонкого кишечника и активность коммерческого трипсина. При анализе влияния заражения цестодами на протеолитическую активность (протеаз и подклассов протеаз) в слизистой оболочке тонкого кишечника в качестве контроля использовали активности протеаз в слизистой оболочке тонкого кишечника незараженных птенцов серебристых чаек.

Определение ингибирующей способности цестод

Для изучения ингибирующей активности использовали гомогенаты цестод, а в качестве источника протеаз служили гомогенаты слизистой оболочки кишечника птенцов серебристой чайки и коммерческий трипсин (MP Biomedicals, USA) (0.01 мг/мл), растворенный в 0.05 М трис-НСl буфере, pH 7.5. Для определения ингибиторной активности к 0.5 мл гомогената слизистой оболочки или к 0.5 мл раствора трипсина добавляли 100 мкл гомогената ленточных червей и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Параллельно в пробу гомогената слизистой оболочки или раствора трипсина добавляли специфичный ингибитор сериновых протеаз (100мМ PMSF) в объеме 100 мкл, а в контрольную пробу – аналогичный объем раствора Рингера для теплокровных животных. Протеолитическую активность во всех пробах измеряли с использованием 0.3% раствора азоказеина (Alarcón et al., 2002). Результаты ингибирования представлены в процентах от контрольных значений активности протеаз в слизистой оболочке тонкого кишечника и активности коммерческого трипсина.

Статистический анализ

Показатели активностей ферментов и СИИ представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартной ошибки ($\pm$ SE). Статистический анализ выполнен с помощью программных пакетов “Microsoft Excel 2010” и STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., Талса, Оклахома, США). Сравнения между значениями активностей ферментов в тонком кишечнике птенцов серебристой чайки и СИИ проводили с использованием непараметрического критерия Уилкоксона–Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0.05$. Изучение взаимосвязи морфометрических параметров цестод и активности протеаз в слизистой оболочке тонкого кишечника серебристых чаек проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цестоды *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina*, *M. ductilus* и *W. cirrosa* паразитировали в тонком кишечнике птенцов серебристой чайки. Установлено, что *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina* имели максимальную СИИ в медиальных фрагментах тонкого кишечника птенцов (табл. 2). В проксимальном фрагменте тонкого кишечника в наибольшем количестве обнаружены *M. ductilus*, в дистальном фрагменте – *W. cirrosa*.

Согласно результатам биохимического анализа, общая активность протеаз снижалась при инвазии *M. ductilus* в проксимальном фрагменте, при инвазии *T. erostris* и *A. tetrabothrioides* в медиальном фрагменте и при инвазии *A. larina* в дистальном

фрагменте тонкого кишечника птенцов серебристой чайки относительно контрольных значений ($p < 0.05$) (табл. 3). Общая активность протеаз повышалась в проксимальных фрагментах тонкого кишечника при паразитировании *A. larina*, *T. erostris*, *A. tetrabothrioides* и *W. cirrosa*, а также в медиальном фрагменте при заражении *W. cirrosa* по сравнению с контролем ($p < 0.05$). Достоверные изменения активностей сериновых протеаз в слизистой оболочке тонкого кишечника серебристой чайки зафиксированы главным образом во фрагментах с максимальными значениями СИИ цестодами. Уменьшение активности сериновых протеаз зарегистрировано в проксимальном фрагменте тонкого кишечника при инвазии *M. ductilus*, в медиальном фрагменте – при инвазии *A. tetrabothrioides*, *T. erostris* и *A. larina*, в дистальном фрагменте – при инвазии *W. cirrosa* и *A. larina* относительно контрольных значений ($p < 0.05$). Повышение активности цистеиновых протеаз установлено в медиальном фрагменте при инвазии *M. ductilus* и *A. larina*, а также в дистальном фрагменте при инвазии *W. cirrosa* и *A. larina* ($p < 0.05$). Кроме того, при паразитировании *M. ductilus* в проксимальном фрагменте отмечено снижение активности металлопротеаз в 2 раза по сравнению с аналогичным показателем контрольного значения ($p < 0.05$). В то же время при заражении *A. tetrabothrioides*, *A. larina* и *W. cirrosa* в проксимальном фрагменте зафиксировано увеличение активности металлопротеаз ($p < 0.05$).

При использовании двухфакторного дисперсионного анализа не обнаружены взаимосвязи активности протеаз (общей активности протеаз, активности металлопротеаз, сериновых и цистеиновых протеаз) в слизистой оболочки тонкого кишечника птиц с размерными характеристиками сколексов и стробил цестод *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina*, *M. ductilus* и *W. cirrosa*.

Таблица 2. Средняя интенсивность инвазии (среднее значение $\pm$ стандартная ошибка, экз.) цестод во фрагментах тонкого кишечника птенцов серебристой чайки *Larus argentatus*

Table 2. Mean intensity (mean $\pm$ standard error, ind.) of cestodes in the segments of the small intestine of the herring gull chicks *Larus argentatus*

Вид цестод	Фрагменты тонкого кишечника		
	проксимальный	медиальный	дистальный
<i>Arctotaenia tetrabothrioides</i>	0.2 $\pm$ 0.02	95.4 $\pm$ 50.7	14.2 $\pm$ 9.0
<i>Tetrabothrius erostris</i>	1.4 $\pm$ 0.7	7.8 $\pm$ 3.4	1.3 $\pm$ 0.8
<i>Alcataenia larina</i>	3.2 $\pm$ 1.8	16.1 $\pm$ 6.4	3.1 $\pm$ 1.4
<i>Microsomacanthus ductilus</i>	176.2 $\pm$ 25.3	2.8 $\pm$ 1.6	1.9 $\pm$ 1.4
<i>Wardium cirrosa</i>	0.4 $\pm$ 0.03	0.7 $\pm$ 0.3	9.9 $\pm$ 4.6

Таблица 3. Общая активность протеаз и подклассов протеаз в слизистой оболочке тонкого кишечника птенцов серебристой чайки в местах локализации цестод

Table 3. Total activity of proteases and protease subclasses in the small intestine mucosa of the herring gull chicks at the sites of cestode localization

Вид цестод	Общая активность протеаз, усл. ед.	Активность подклассов протеаз		
		Металлопротеазы, усл. ед.	Сериновые протеазы, усл. ед.	Цистеиновые протеазы, усл. ед.
Проксимальный фрагмент тонкого кишечника				
Контроль	1.4 ± 0.2	0.7 ± 0.05	0.6 ± 0.03	0.04 ± 0.01
<i>A. tetrabothrioides</i>	2.2 ± 0.2 *	0.9 ± 0.07	0.9 ± 0.08	0.03 ± 0.01
<i>T. erostris</i>	3.4 ± 0.3 *	1.8 ± 0.5 *	0.8 ± 0.5	0.05 ± 0.01
<i>A. larina</i>	2.1 ± 0.2 *	1.1 ± 0.05 *	0.77 ± 0.06	0.06 ± 0.01
<i>M. ductilus</i>	0.85 ± 0.05 *	0.35 ± 0.03 *	0.3 ± 0.01 *	0.06 ± 0.01
<i>W. cirrosa</i>	2.6 ± 0.3 *	1.7 ± 0.1 *	0.51 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Медиальный фрагмент тонкого кишечника				
Контроль	2.0 ± 0.04	1.1 ± 0.3	0.64 ± 0.06	0.03 ± 0.005
<i>A. tetrabothrioides</i>	1.4 ± 0.1*	0.7 ± 0.05	0.31 ± 0.01 *	0.06 ± 0.01
<i>T. erostris</i>	1.3 ± 0.1*	0.8 ± 0.04	0.25 ± 0.02 *	0.06 ± 0.01
<i>A. larina</i>	1.9 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.05 *	0.09 ± 0.01 *
<i>M. ductilus</i>	1.9 ± 0.2	0.8 ± 0.09	0.7 ± 0.08	0.11 ± 0.01 *
<i>W. cirrosa</i>	2.9 ± 0.3 *	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.02 ± 0.005
Дистальный фрагмент тонкого кишечника				
Контроль	3.3 ± 0.6	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.4	0.065 ± 0.022
<i>A. tetrabothrioides</i>	2.9 ± 0.3	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.3	0.023 ± 0.005 *
<i>T. erostris</i>	2.5 ± 0.4	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.05 ± 0.01
<i>A. larina</i>	1.5 ± 0.6 *	0.9 ± 0.1	0.22 ± 0.02 *	0.14 ± 0.05 *
<i>M. ductilus</i>	2.8 ± 0.4	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.06 ± 0.01
<i>W. cirrosa</i>	2.6 ± 0.3	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.01 *	0.13 ± 0.04 *

Пр и м е ч а н и е. * Различия достоверны относительно контроля, *p* < 0.05.

Установлено, что все исследованные цестоды способны адсорбировать на поверхности тегумента протеолитические ферменты. Во всех фракциях, смытых с поверхности червей, определена активность протеаз. Следует отметить, что активность сериновых протеаз во всех десорбированных фракциях превышала активность металлопротеаз (*p* < 0.05) (рис. 1).

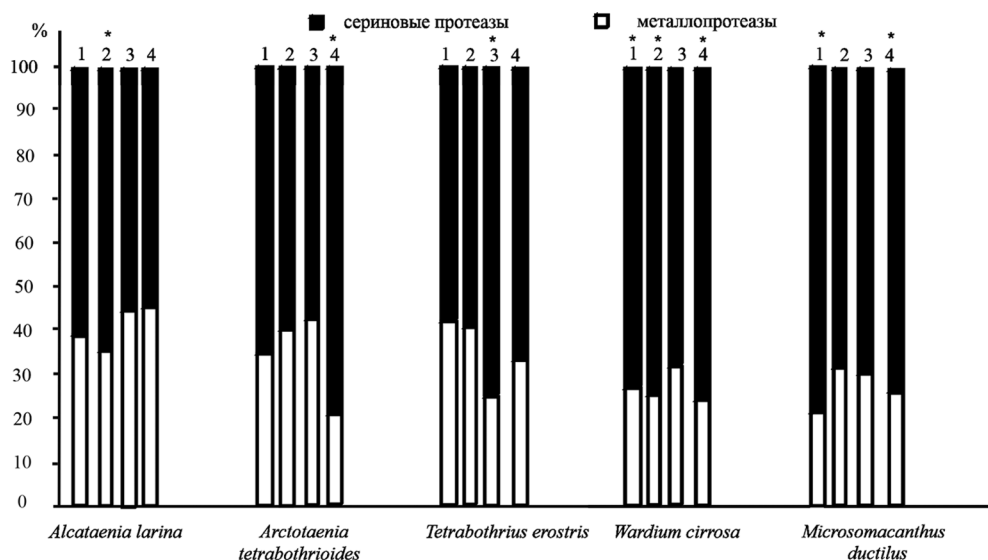


Рисунок 1. Доли сериновых протеаз и металлопротеаз во фракциях, десорбированных с поверхности тегумента цестод *M. ductilus*, *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina* и *W. cirrosa* (%). Доля сериновых протеаз превышала долю металлопротеаз (*различия достоверны относительно значений доли металлопротеаз, $p < 0.05$). 1 – фракция Д₁, 2 – фракция Д₂, 3 – фракция Д₃, 4 – фракция Д₄.

Figure 1. The proportion of serine proteases and metalloproteases in different fractions washed of cestode tegument *M. ductilus*, *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina* и *W. cirrosa* (%). The proportion of serine proteases exceeded the proportion of metalloproteases (*the differences are significant relative to the values of the proportion of metalloproteases, $p < 0.05$). 1 – fraction Д₁, 2 – fraction Д₂, 3 – fraction Д₃, 4 – fraction Д₄.

Экспериментальные исследования показали, что гомогенаты цестод *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina* и *W. cirrosa* ингибировали активность коммерческого трипсина, а значения инактивации имели показатели, аналогичные показателям при действии специфического ингибитора сериновых протеаз – PMSF ($p > 0.05$) (рис. 2).

Кроме того, гомогенаты *T. erostris* и *W. cirrosa* снижали активность протеаз из слизистой оболочки тонкого кишечника птенцов серебристой чайки в большей степени по сравнению с другими видами цестод ($p < 0.05$) (рис. 3). При воздействии на активность протеаз слизистой оболочки гомогенаты червей имели более высокий ингибиторный эффект относительно PMSF. Исключение составил гомогенат *M. ductilus* – значения долей ингибирования активности протеаз при влиянии гомогената *M. ductilus* и PMSF не имели достоверных различий.

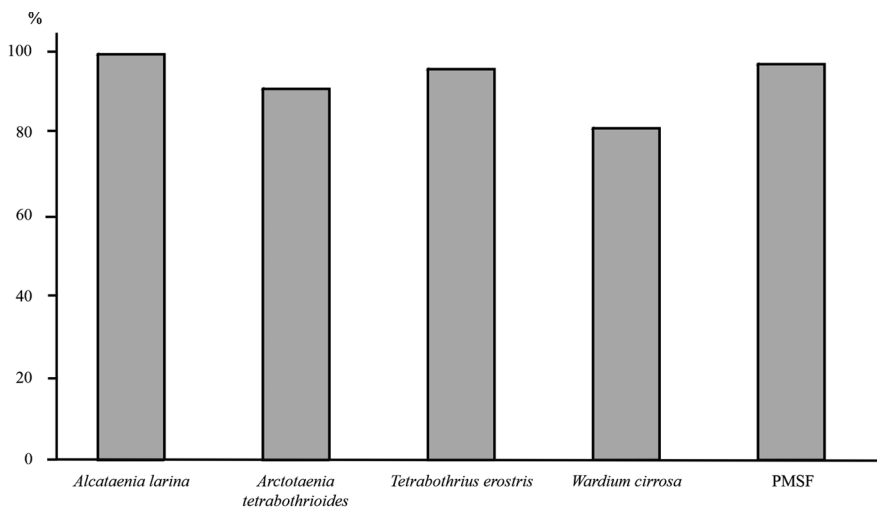


Рисунок 2. Влияние гомогенатов цестод и PMSF на активность коммерческого трипсина (0.01 мг/мл). Представлены доли ингибирования активности коммерческого трипсина гомогенатами цестод и PMSF (%).

Figure 2. Effect of cestode homogenates and PMSF on the activity of commercial trypsin (0.01 mg/ml). The figure shows the proportion of inhibition of commercial trypsin activity by cestode and PMSF homogenates (%).

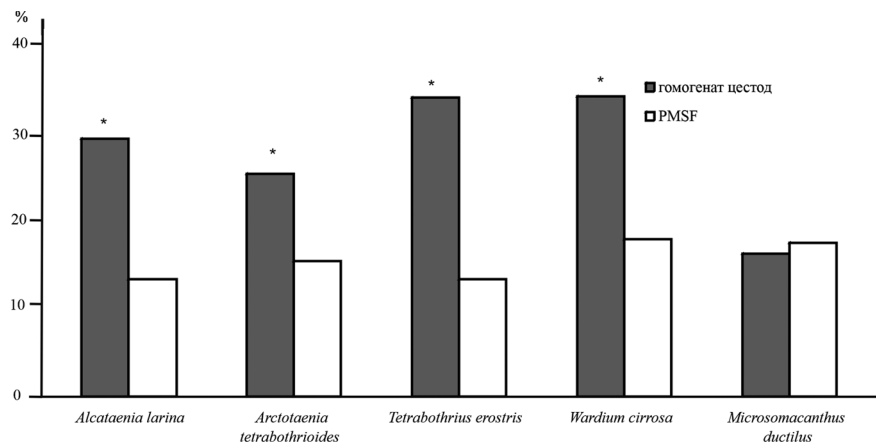


Рисунок 3. Влияние гомогенатов цестод и PMSF на активность протеаз слизистой оболочки тонкого кишечника птенцов серебристой чайки. Представлены доли ингибирования активности протеаз гомогенатами цестод и PMSF (%). Гомогенаты цестод *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina* и *W. cirrosa* обладали более высоким ингибиторным эффектом по сравнению с воздействием PMSF (ингибитора сериновых протеаз) (*различия достоверны относительно значений доли ингибирования PMSF, $p < 0.05$).

Figure 3. Effect of cestode homogenates and PMSF on the activity of proteases of the small intestine mucosa in herring gull chicks. The figure shows the proportion of inhibition of protease activity by cestode and PMSF homogenates (%). Cestode homogenates *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina* and *W. cirrosa* had a higher inhibitory effect compared with PMSF (serine protease inhibitor) (*differences are significant relative to the values of the proportion of PMSF inhibition, $p < 0.05$).

При изучении особенностей взаимоотношений в системе «паразит–хозяин» исследователи неоднократно отмечали, что протеазы в слизистой оболочке кишечника хозяина наиболее чувствительны к цестодной инвазии (Извекова, Куклина, 2014; Фролова, Извекова, 2018; Izvekova, 2013). Согласно результатам проведенного исследования, в местах локализации цестод с максимальными значениями СИИ (*T. erostris*, *A. tetrabothrioides*, *M. ductilus*) в медиальном фрагменте тонкого кишечника птенцов серебристой чайки снижалась активность протеаз. Повышение активности протеаз отмечено главным образом в проксимальном фрагменте при паразитировании *A. larina*, *T. erostris*, *A. tetrabothrioides* и *W. cirrosa*. Изменения общей протеолитической активности в слизистой оболочке кишечника неоднократно регистрировались при изучении инвазий ленточными червями, окончательным хозяином которых были позвоночные животные – рыбы и морские птицы (Куклина, Куклин, 2017; Фролова, Извекова, 2018; Kuklina, Kuklin, 2011, 2016a, 2016b, 2018; Izvekova, Solovyev, 2016; Frolova et al., 2019). Активность протеаз снижалась у серебристых чаек при инвазии *T. erostris*, *Diphylobothrium dendriticum* (Cobbold, 1858) и у моевок при инвазии *T. erostris*, а повышалась у моевок при инвазии *A. larina*, у серебристых чаек при инвазии *W. cirrosa* (Куклина, Куклин, 2017; Kuklina, Kuklin, 2011, 2016a, 2016b, 2018). На основании полученных результатов было сделано предположение, что процессы повышения или снижения активности протеаз в слизистой оболочке кишечника инвазированного хозяина зависят от морфологических особенностей прикрепительного аппарата цестод (Извекова, Куклина, 2014). При заражении цестодами с мощным прикрепительным аппаратом, оснащенным крючьями заякоривающегося типа и присосками, активность протеаз повышалась из-за повреждения клеток тонкого кишечника хозяина и выхода в просвет кишечника внутриклеточных ферментов (Куклина, Куклин, 2017; Izvekova, Solovyev, 2016; Kuklina, Kuklin, 2011; Frolova et al., 2019). При заражении цестодами, сколекс которых имеет присоски или ботридии, зафиксировано снижение активности протеаз (Фролова, Извекова, 2018; Izvekova, Solovyev, 2016; Kuklina, Kuklin, 2016a, 2016b, 2018).

В настоящем исследовании представлены результаты инвазии пятью видами цестод, различающихся не только особенностями прикрепительного аппарата, но размерами сколексов и стробил (табл. 1). К крупным видам цестод относятся *A. tetrabothrioides* и *T. erostris*, но органы прикрепления на сколексе представлены присосками и ботридиями соответственно (Темирова, Скрыбин, 1978; Ryzhikov et al., 1985, личные данные). Сколексы *M. ductilus*, *A. larina* и *W. cirrosa* оснащены четырьмя присосками и крючьями (Бондаренко, Контримавичус, 2006; Ryzhikov et al., 1985). Цестода *A. larina* обладает самым мощным прикрепительным аппаратом – четыре мускулистые

присоски и 20–23 крупных крючка (Ryzhikov et al., 1985). Из всех представленных цестод размеры стробил *M. ductilus* наименьшие, но диаметр сколекса и размер крючков превышает таковые у *W. cirrosa* (Бондаренко, Контримавичус, 2006; Ryzhikov et al., 1985).

Снижение активности сериновых протеаз в тонком кишечнике птенцов серебристой чайки отмечено в местах массовой локализации червей *M. ductilus*, *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina* и *W. cirrosa*. Следует отметить, что указанная тенденция (снижение сериновых протеаз в слизи хозяина при инвазии цестодами с максимальными значениями СИИ) не зависела от морфометрических параметров червей и строения его прикрепительного аппарата. Аналогичные результаты зарегистрированы при заражении синца цестодами *Proteocephalus torulosus* (Batsch, 1786) (Фролова, Извекова, 2018). Исследователи предположили, что этот факт связан с адсорбцией сериновых протеаз хозяина на поверхности тегумента цестод. В ходе настоящего исследования показано, что цестоды *M. ductilus*, *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina* и *W. cirrosa* адсорбировали на своей поверхности протеазы, большую часть из которых представляли сериновые протеазы. Известно, что на протяжении всей своей жизни паразиты, в том числе и цестоды, используют ресурсы, производимые хозяином (Dalton et al., 2004). Ленточные черви, лишённые пищеварительной системы, в тонком кишечнике позвоночных животных абсорбируют нутриенты (аминокислоты, моносахариды и др.) и адсорбируют на поверхности тегумента пищеварительные ферменты хозяина (Dalton et al., 2004; Izvekova et al., 2017).

Кроме того, уменьшение активности сериновых протеаз в тонком кишечнике хозяина может быть вызвано ингибированием цестодами их активности. Экспериментальные исследования показали, что *M. ductilus*, *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina* и *W. cirrosa* способны инактивировать коммерческий трипсин и протеазы из слизи оболочки тонкого кишечника чаек. Аналогичные результаты получены при изучении влияния цестод *E. rugosum*, *C. laticeps* и *T. nodulosus* из кишечника налим, леща и щуки соответственно на активность протеаз (Frolova et al., 2019). Более того, авторами установлено, что не только экстракты цестод, но и инкубационная среда, в которой содержались цестоды, блокировала протеазы хозяина и коммерческий трипсин (Frolova, Izvekova, 2023). Из гомогената *T. nodulosus* выделили и описали два новых белка типа Кунитца, которые потенциально могут выступать в роли ингибиторов сериновых протеаз хозяина (Rogozhin et al., 2019).

Наряду с этим, повышение активности цистеиновых протеаз зафиксировано в медиальном фрагменте тонкого кишечника при инвазии *M. ductilus* и *A. larina*, в дистальном фрагменте при инвазии *W. cirrosa* и *A. larina*. Ранее установлено, что при инвазии цестодами *A. larina* моевки и *W. cirrosa* серебристой чайки в местах

локализации общая протеолитическая активность также увеличивалась в слизи оболочке тонкого кишечника хозяина (Куклина, Куклин, 2017; Kuklina, Kuklin, 2011). Можно сделать предположение, что увеличение активности цистеиновых протеаз, в состав которых входят лизосомальные ферменты, происходит вследствие повреждения клеток эпителия крючьями прикрепительного аппарата вышеперечисленных цестод (табл. 1). Данные о повышении активности цистеиновых протеаз согласуются с данными об инвазии шуки ленточными червями *T. nodulosus* (Izvekova, Solovyev, 2016).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В местах максимального скопления ленточных червей *M. ductilis*, *A. tetrabothrioides*, *T. erostris*, *A. larina* и *W. cirrosa* в тонком кишечнике птенцов серебристой чайки отмечено достоверное снижение активности сериновых протеаз. Такое снижение активности связано с адсорбцией фермента на поверхности тегумента цестод и ингибированием его активности цестодами. Повышение активности цистеиновых протеаз при инвазии цестодами *M. ductilis*, *A. larina* и *W. cirrosa*, вероятно, вызвано повреждением клеток тонкого кишечника прикрепительным аппаратом червей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Ежову А. В. (Мурманский морской биологический институт РАН, Мурманск, Россия) за помощь в сборе материала, а также администрации и сотрудникам Кандалакшского государственного природного заповедника за помощь в проведении полевых работ (Кандалакша, Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена по теме «Экология, физиология и паразитология птиц Арктического бассейна в условиях климатических и антропогенных трансформаций среды обитания» (№124013000721-1) в рамках государственного задания ММБИ РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Мурманского морского биологического института Российской академии наук (Протокол № 4 от 24 февраля 2024 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бондаренко С.К., Контримавичус В.Л. 2006. Аплопаракиды диких и домашних птиц. Основы цестодологии. М., Наука, 443 с. [Bondarenko S.K., Kontrimavichus V.L. 2006. Aploparaksidae of wild and domesticated birds. M., Nauka, 443 pp. (in Russian)].
- Извекова Г.И., Куikliна М.М. 2014. Заражение цестодами и активность пищеварительных гидролаз позвоночных животных. Успехи современной биологии 134 (3): 304–315. [Izvekova G.I., Kuklina M.M. 2014. Infection by cestodes and activity of digestive enzymes in invertebrate hosts. Biological Bulletin Reviews 134 (3): 304–315. (in Russian)].
- Кузьмина В.В. 1976. Применение метода последовательной десорбции α -амилазы с отрезка кишки при изучении мембранного пищеварения у рыб. Вopr. ихтиологии 16 (5): С. 944–946. [Kuz'mina V.V. 1976. Application of the method of sequential desorption of α -amylase from an intestine segment in the study of membrane digestion in fish. Vopr. Ikhtiolog. 16 (5): 944–946. (in Russian)].
- Куikliн В.В., Кисова Н.Е. 2007. Гельминты чаек рода *Larus* Баренцева моря. Вест. Южного Научного Центра 3 (2): 64–71. [Kuklin V.V., Kisova N.E. 2007. Helminths of gulls of the genus *Larus* of the Barents Sea. Vest. YUzhnogo Nauchnogo Centra 3 (2): 64–71. (in Russian)].
- Куikliна М.М. 2015. Биохимические показатели плазмы крови серебристой чайки при инвазии *Tetrabothrius erostris* (Cestoda: Tetrabothriidae). Российский паразитологический журнал 4: 79–84. [Kuklina M.M. 2015. Biochemical values of blood in herring gulls at invasion by *Tetrabothrius erostris* (Cestoda: Tetrabothriidae). Russian Journal of Parasitology 4: 79–84. (in Russian)]. [https://doi: 10.12737/16664](https://doi.org/10.12737/16664)
- Куikliна М.М., Куikliн В.В. 2017. *Wardium cirrosa* (Cestoda: Aploparaksidae): локализация в кишечнике серебристой чайки и влияние на пищеварительную активность хозяина. Паразитология 51 (3): 213–223. [Kuklina M.M., Kuklin V.V. 2017. *Wardium cirrosa* (Cestoda: Aploparaksidae): localization in the intestine of the herring gull and impact on digestive activity of the host. Parazitologia 51 (3): 213–223. (in Russian)].
- Спасская Л.П., Спасский А.А. 1978. Цестоды птиц СССР. Т. 9. Дилепидиды лимнофильных птиц. М., Наука, 315 с. [Spasskaya L.P., Spasskii A.A. 1978. Cestodes of birds of the USSR. V. 9. Dilepidids of limnophilic birds. M., Nauka, 315 pp. (in Russian)].
- Темирова С.И., Скрыбин А.С. 1978. Основы цестодологии. Тетработриаты и мезоцистоидаты. М., Наука, 186 с. [Temirova S.I., Skryabin A.S. 1978. Fundamentals of cestodology. Tetrobothryates and mesocystoidates. M., Nauka, 186 pp. (in Russian)].
- Фроloва Т.В., Извекова Г.И. 2018. Влияние заражения цестодой *Proteocephalus torulosus* Batsch, 1786 на активность ферментов в кишечнике синца (*Ballerus ballerus* L.). Паразитология 52 (4): 292–303. [Frolova T.V., Izvekova G.I. 2018. The influence of cestode infection with *Proteocephalus torulosus* Batsch, 1786 on the enzyme activity in the intestine of the zope (*Ballerus ballerus* L.). Parazitologia 52 (4): 292–303. (in Russian)]. [https://doi: 10.7868/S0031184718040042](https://doi.org/10.7868/S0031184718040042)
- Alarcón F.J., Martínez T.F., Barranco P., Cabello T., Díaz M., Moyano F.J. 2002. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus errugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology 32: 265–274. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00087-X)
- Dalton J.P., Skelly P., Halton D.W. 2004. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. Can. J. Zool. 82: 211–232. <https://doi.org/10.1139/z03-213>

- Frolova T.V., Izvekov E.I., Solovyev M.M., Izvekova G.I. 2019. Activity of proteolytic enzymes in the intestine of bream *Abramis brama* infected with cestodes *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidae). Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 235: 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.05.009>.
- Frolova T.V., Izvekova G.I. 2022. A comparative analysis of the effect of intestinal cestodes in different fish species on proteolytic enzyme activity. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 58 (3): 644–651. <https://doi.org/10.1134/S0022093022030024>
- Frolova T.V., Izvekova G.I. 2023. Metabolic adaptation of fish intestinal helminthes: inhibitory ability towards proteases in cestodes *Triaenophorus nodulosus*. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 59 (5): 370–377. <https://doi.org/10.31857/S0044452923050042>
- Izvekova G.I. 2013. Activity of digestive enzymes in burbot *Lota lota* (Linnaeus) depending on their infestation with *Eubothrium rugosum* (Batch) (Cestoda, Pseudophyllidae). Inland Water Biol. 6: 57–61. <https://doi.org/10.1134/S1995082913010069>
- Izvekova G.I., Solovyev M.M. 2016. Characteristics of the effect of cestodes parasitizing the fish intestine on the activity of the host proteinases. Biology Bulletin 43: 146–151. <https://doi.org/10.1134/S1062359016010076>
- Izvekova G.I., Frolova T.V., Izvekov E.I. 2017. Adsorption and inactivation of proteolytic enzymes by *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda). Helminthologia 54(1): 3–10. <https://doi.org/10.1515/helm-2017-0001>
- Kuklin V.V., Kuklina M.M. 2021. Age Dynamics of Helminth Fauna of the Herring Gull (*Larus argentatus*) in Kola Bay, Barents Sea. Biology Bulletin 48 (8): 1160–1169. <https://doi.org/10.1134/S1062359021080173>
- Kuklina M.M., Kuklin V.V. 2006. Effect of helminthic infestation on the biochemical parameters of gulls of the genus *Larus* in the Barents Sea region. Doklady Biological Sciences 411 (1): 471–474. <https://doi.org/10.1134/S0012496606060135>
- Kuklina M.M., Kuklin V.V. 2011. Peculiarities of protein hydrolysis on the digestive transport surfaces of the intestine of the kittiwake *Rissa tridactyla* and *Alcataenia larina* (Cestoda, Dilepididae) parasitizing it. Biology Bulletin 38 (5): 470–475. <https://doi.org/10.1134/S1062359011050098>
- Kuklina M.M., Kuklin V.V. 2016a. The activities of digestive enzymes as determinant factor in the localization of *Tetrabothrius erostris* (Cestoda: Tetrabothriidae) in the intestine of the herring gull *Larus argentatus* Pontoppidan. Inland Water Biology 9 (2): 189–195. <https://doi.org/10.134/S1995082916010107>
- Kuklina M.M., Kuklin V.V. 2016b. *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda: Diphyllobothriidae) in the intestinal tract of the herring gull *Larus argentatus*: localization and trophic parameters. Biology Bulletin 43 (4): 329–334. <https://doi.org/10.1134/S1062359016040063>
- Kuklina M.M., Kuklin V.V. 2018. Effect of Cestodal Infestation on the Distribution Pattern of Digestive Enzyme Activities along the Small Intestine of the Kittiwake (*Rissa tridactyla*). Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology 54(4): 292–299. <https://doi.org/10.1134/S0022093018040051>
- Rogozhin E.A., Solovyev M.M., Frolova T.V., Izvekova G.I. 2019. Isolation and partial structural characterization of new Kunitz-type trypsin inhibitors from the pike cestode *Triaenophorus nodulosus*. Molecular & Biochemical Parasitology 233. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111217>
- Ryzhikov K.M., Rusavy B., Khokhlova I.G., Tolkatchova L.M., Kornychuk V.V. 1985. Helminths of Fish-Eating Birds of the Palaearctic Region II. Academia Publishing House, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, Czechoslovakia, 411 pp.

THE INFLUENCE OF GESTODES PARASITIZING
IN THE SMALL INTESTINE OF HERRING GULL CHICKS
ON THE ACTIVITY OF THE HOST PROTEASES

M. M. Kuklina, V. V. Kuklin

Keywords: cestodes, herring gull, serine protease, trypsin, protease inhibitors

SUMMARY

The activity of proteases and subclasses of proteases in small intestines of the herring gull (*Larus argentatus* (Pontoppidan, 1763)) chicks were determined. Changes of the protease activity in chicks infested by cestodes *Tetrabothrius erostris* (Loennberg, 1889) (Cestoda: Tetrabothriidae), *Microsomacanthus ductilus* (Linton, 1927) (Cestoda: Hymenolepididae), *Wardium cirrosa* (Krabbe, 1869) (Cestoda: Aploparaksidae), *Arctotaenia tetrabothrioides* (Loennberg, 1890) and *Alcataenia larina* (Krabbe, 1869) (Cestoda: Dilepididae) were studied. The activity of serine proteases decreased in the small intestine of gulls at the sites of cestode parasitism with high infestation values (*M. ductilus* in the proximal segment, *W. cirrosa* in the distal segment, *A. tetrabothrioides*, *T. erostris* and *A. larina* in the medial segment). The activity of cysteine proteases increased in the sites of localization of cestodes *M. ductilus*, *W. cirrosa* and *A. larina*. All the studied cestodes adsorbed proteases on the surface of the tegument, most of those were represented by serine proteases. Cestode homogenates of *W. cirrosa*, *M. ductilus*, *A. tetrabothrioides*, *T. erostris* and *A. larina* inhibited the activity of host proteases and the activity of commercial trypsin.