

АКТИВНОСТЬ ПРОТЕАЗ В ТОНКОМ КИШЕЧНИКЕ АТЛАНТИЧЕСКОГО ГЛУПЫША *FULMARUS GLACIALIS* ПРИ ИНВАЗИИ *TETRABOTHRIUS MINOR* (CESTODA: TETRABOTHRIIDAE)

© 2023 г. М. М. Куклина^{1,*}, В. В. Куклин¹

¹Мурманский морской биологический институт РАН, Мурманск, Россия

*e-mail: MM_Kuklina@mail.ru

Поступила в редакцию 19.04.2023 г.

После доработки 23.06.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Изучено влияние инвазии *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae) на протеолитическую активность в слизистой оболочке тонкого кишечника атлантического глупыша *Fulmarus glacialis*. Рассмотрены аспекты изменения общей активности протеаз и протеаз различных подклассов (металлопротеаз, сериновых и цистеиновых протеаз) при инвазии тетработридами, проведена оценка способности *T. minor* инактивировать протеазы из слизистой оболочки кишечника птиц и коммерческий трипсин. Установлено, что в местах локализации *T. minor* (проксимальных и медиальных фрагментах тонкого кишечника) протеолитическая активность снижена за счет уменьшения активности сериновых протеаз и металлопротеаз. Обнаружена обратная зависимость значений протеолитической активности в слизистой оболочке тонкого кишечника хозяина от показателей заражения цестодами — чем выше интенсивность инвазии *T. minor*, тем ниже активность протеаз, в том числе металлопротеаз и сериновых протеаз. Отмечены способность гомогенатов *T. minor* ингибировать активность протеаз из слизистой оболочки кишечника глупыша и активность коммерческого трипсина разной концентрации.

Ключевые слова: *Tetrabothrius minor*, *Fulmarus glacialis*, активность протеаз, трипсин, сериновые протеазы, ингибирование

DOI: 10.31857/S0044452923050054, **EDN:** NDDTWL

ВВЕДЕНИЕ

Атлантические глупыши — морские птицы, большую часть своей жизни проводящие в море и появляющиеся на побережье только в период размножения [1]. Глупыши добывают корм в поверхностных горизонтах воды на глубине не более 1 м, а основу их рациона составляют головоногие моллюски, отходы рыбного промысла, рыба и полихеты [1, 2]. В баренцевоморском регионе колонии глупышей отмечены в Северной части Баренцева моря на архипелагах Новая Земля и Земля Франца-Иосифа [3, 4].

По данным паразитологических исследований установлено, что в гельминтофауне атлантических глупышей Баренцева моря доминируют черви *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae) [2]. Высокие показатели инвазии *T. minor* у глупышей отмечены и в западной, и в восточной частях открытой акватории Баренцева моря, а также в его прибрежных районах. Ленточные черви *T. minor* используют атлантического глупыша в качестве окончательного хозяина. Тетработрииды локализуются в тонком кишечнике птиц, активно растут и продуцируют большое количество яиц для успешной реализации

жизненного цикла. В комфортной среде кишечника с постоянной температурой и питательными веществами цестоды, тем не менее, должны активно противостоять воздействию как иммунной системы, так и пищеварительных ферментов хозяина.

По данным ранее проведенных исследований отмечены определенные изменения в обмене веществ атлантических глупышей при заражении *T. minor* [5]. В плазме крови повышались концентрации общего белка, мочевой кислоты, гамма-глобулинов, модифицированной формы альбумина и активности трансаминаз у птиц, инвазированных половозрелыми цестодами. Указанные изменения биохимических показателей крови свидетельствуют об активизации белкового обмена и иммунной системы, а также об интоксикации организма хозяина при длительном паразитировании цестод *T. minor*.

Инвазия цестодами вызывает у позвоночных животных заметные изменения в активности пищеварительных протеаз [6–10]. Так, повышение активности протеаз зафиксировано при паразитировании цестод, сколекс которых оснащен мощным прикрепительным аппаратом с крупными за-

якоривающимися крючьями. В частности, увеличение протеолитической активности наблюдалось в кишечнике моевок (*Rissa tridactyla*) при заражении *Alcataenia larina*, в кишечнике щуки (*Esox lucius*) при заражении *Triaenophorus nodulosus* [8, 9]. Снижение активности протеаз показано для большинства случаев инвазии цестодами, сколекс которых оснащен только присосками или ботридиями [9–13]. Более того, установлено, что общее снижение активности протеаз происходит, прежде всего, за счет уменьшения активности сериновых протеаз (трипсина и химотрипсина) [9, 10].

Цель работы – определение общей активности протеаз и их подклассов (сериновых и цистеиновых протеаз, металлопротеаз) в слизистой оболочке тонкого кишечника атлантического глупыша *F. glacialis* при инвазии цестодами *T. minor*, а также изучение способности *T. minor* ингибировать протеолитическую активность.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Атлантический глупыш *F. glacialis* и ленточные черви *T. minor* послужили в качестве материала исследования. Птицы ($n = 10$) отловлены на акватории Баренцева моря в июле 2015 г. Глупышей добывали с разрешения Федеральной службы по надзору в сфере природопользования России (№ 14/2015). Соблюдены все применимые международные, национальные и/или институциональные руководящие принципы по уходу и использованию животных.

Птиц усыпляли хлороформом и взвешивали. Желудочно-кишечный тракт вырезали, отделяли печень и тонкий кишечник, которые затем очищали от брыжеек и жира и взвешивали. Тонкий кишечник делили на три фрагмента: проксимальный (от пилорического сфинктера), медиальный и дистальный. Химус собирали и использовали для паразитологического анализа. Слизистую оболочку каждого отдела снимали шпателем для биохимического анализа. Процедуру вскрытия птиц проводили при температуре +4°C.

Паразитологический анализ. Из каждого фрагмента тонкого кишечника извлекали обнаруженных ленточных червей, подсчитывали их количество, проводили систематическую идентификацию и определяли степень их зрелости. Устанавливали интенсивность инвазии (ИИ – количество экземпляров данного вида паразита в одной особи хозяина), рассчитывали экстенсивность инвазии (ЭИ – отношение количества птиц, зараженных паразитом данного вида, к общему количеству птиц в выборке) и среднюю интенсивность инвазии (СИИ). ИИ и СИИ вычисляли как для особей птиц, так и для каждого фрагмента тонкого кишечника. Обнаруженных червей использовали для экспериментальных исследований. Для этого гельминтов трижды

промывали охлажденным раствором Рингера для теплокровных животных и взвешивали.

Приготовление гомогенатов червей и слизистой оболочки кишечника птиц. Навески слизистой кишечника и ленточных червей гомогенизировали в охлажденном растворе Рингера для теплокровных животных в соотношении 1:20 (для слизистой кишечника) и 1:10 (для ленточных червей). Затем полученные гомогенаты центрифугировали при 9000 об/мин в течение 5 мин при 4°C на центрифуге Centurion Scientific CR4000R (Britain). Полученные супернатанты использовали для определения протеолитической и ингибиторной активностей.

Определение протеолитической активности. Активность протеаз (АП) (трипсин КФ 3.4.21.4, химотрипсин КФ 3.4.21.1 и дипептидазы КФ 3.4.12.18) в гомогенате слизистой кишечника и активность коммерческого трипсина (MP Biomedicals, USA) измеряли с использованием 0.3% раствора азоказеина (Sigma, USA) в качестве субстрата, приготовленного на 0.05 М трис-НСI буфере, рН 7.5 [14]. 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. Затем центрифугировали при 9000 об/мин в течение 5 мин. Оптическую плотность супернатанта измеряли в кювете толщиной 1 см при длине волны 440 нм на спектрофотометре Jenway 6305 un/vis (Britain).

Одновременно проводили реакции для определения подклассов протеаз. Использовали ингибиторы: 100 мМ PMSF (фенил-метил-сульфонил-флуорид) (Sigma, USA), растворенный в DMSO (диметилсульфоксид) (Sigma, USA) – ингибитор сериновых протеаз; 0.5 М ЭДТА (Sigma, USA), растворенный в 1 М NaOH – ингибитор металлопротеаз; 1 мМ E-64 (Sigma, USA) – ингибитор цистеиновых протеаз. К 0.5 мл гомогената слизистой оболочки 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.

Активность ферментов представлена в виде условных единиц (усл. ед.) (разность оптической плотности субстрата и холостой пробы на грамм влажной массы ткани слизистой кишечника за час). Рассчитано соотношение (%) подклассов протеаз.

Определение ингибирующей способности червей. Для изучения ингибирующей активности червей использовали их гомогенаты *T. minor*, а в качестве источника протеаз служили гомогенаты слизистой оболочки кишечника атлантического глупыша и коммерческий трипсин (MP Biomedicals, USA) в концентрации 0.005, 0.01, 0.015 и 0.02 мг/мл, приготовленные на 0.05 М трис-НСI буфере, рН 7.5. Для определения ингибиторной активности к 0.5 мл го-

могената слизистой или к 0.5 мл раствора трипсина с определенной концентрацией добавляли 100 мкл гомогената ленточных червей, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Одновременно в контрольную пробу добавляли специфичный ингибитор сериновых протеаз (100 мМ PMSF) в объеме 100 мкл, а в холостую пробу – аналогичный объем раствора Рингера для теплокровных животных. Протеолитическую активность во всех пробах измеряли с использованием 0.3% раствора азо-казеина. Результаты представлены в процентах от исходных значений протеаз (гомогенат слизистой кишечника и раствор трипсина).

Статистическая обработка результатов. Результаты морфометрических измерений, показатели активностей ферментов и СИИ представлены в виде среднего значения \pm ошибки средней (\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 атлантического глупыша, СИИ, массы червей, а также морфометрических измерений птиц проводили с использованием непараметрического критерия Уилкоксона–Манна–Уитни. Взаимосвязь между долей сериновых протеаз в слизистой оболочке кишечника и долей инактивации протеаз гомогенатами цестод *T. minor* проверяли с помощью корреляционного анализа. Зависимость между ингибирующей способностью и концентрацией трипсина изучали при помощи регрессионного анализа, а достоверность различий между влиянием гомогенатов половозрелых и молодых червей на активность трипсина проверяли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что в тонком кишечнике атлантического глупыша паразитировали ленточные черви *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae). Экстенсивность инвазии составила 100%, интенсивность инвазии варьировала от 79 до 696 экз. Большая часть червей обнаружена в проксимальном фрагменте кишечника (рис. 1), СИИ в проксимальном фрагменте превышала СИИ в медиальном отделе более чем в 8 раз ($p < 0.01$). Отмечено, что в проксимальном фрагменте паразитировали неполовозрелые особи *T. minor*. Их стробилы имели небольшой размер: длина изменялась от 1 до 5.7 см, а средняя масса червей в проксимальном фрагменте кишечника составляла 0.65 ± 0.15 г. В медиальном фрагменте обнаружены главным образом половозрелые цестоды *T. minor*, в их стробилах были членики со зрелыми яйцами. Длина стробил превышала 20 см, средняя масса червей в медиальном фрагменте составляла 0.24 ± 0.05 г. В дистальном фрагменте кишечника встречались одиночные экземпляры цестод.

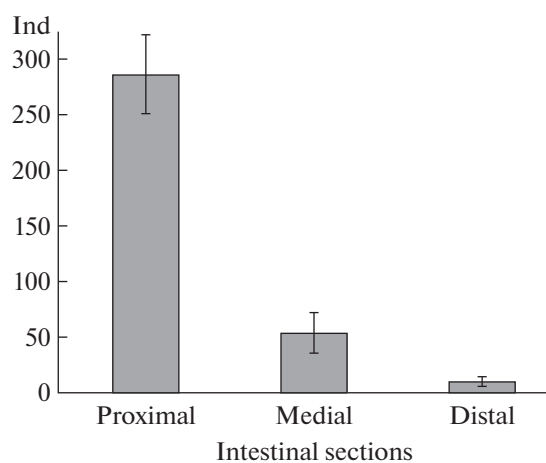


Рис. 1. Распределение ленточных червей *Tetrabothrius minor* в тонком кишечнике атлантического глупыша. На графике представлены показатели средней интенсивности инвазии *T. minor* для каждого фрагмента кишечника.

Проведено сравнение значений активностей протеаз в проксимальном и медиальном фрагментах тонкого кишечника с аналогичными показателями дистального фрагмента (рис. 2). Установлено, что в слизистой кишечника проксимального и медиального фрагментов активности протеаз имели более низкие значения ($p < 0.05$). Отмечены различия в значениях активности подклассов протеаз и в их соотношении для каждого фрагмента кишечника. Зафиксировано снижение активностей сериновых протеаз в проксимальном и медиальном фрагментах, металлопротеаз – в проксимальном фрагменте, цистеиновых протеаз – в медиальном фрагменте относительно параметров дистального фрагмента ($p < 0.05$).

Как уже отмечалось выше, все исследованные глупыши заражены цестодами *T. minor*, поэтому для проведения сравнительного анализа птицы были разделены на две группы в соответствии с показателями инвазии – ИИ и СИИ (табл. 1). Выделены глупыши с низкими (группа I) и высокими (группа II) параметрами заражения. СИИ у птиц из группы II превышало СИИ у птиц из группы I в 3.7 раза ($p < 0.05$). У птиц группы II были ниже значения массы тела, а массы их тонкого кишечника и слизистой оболочки кишечника, напротив, выше по сравнению с аналогичными показателями у птиц группы I ($p < 0.05$).

Установлено, что АП слизистой оболочки кишечника в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника у птиц с высокими показателями заражения (группа II) была ниже (более чем в два раза) по сравнению с АП птиц группы I ($p < 0.05$) (табл. 2). Аналогичная тенденция прослежена для сериновых протеаз и металлопротеаз ($p < 0.05$). Следует отметить отсутствие активности цистеи-

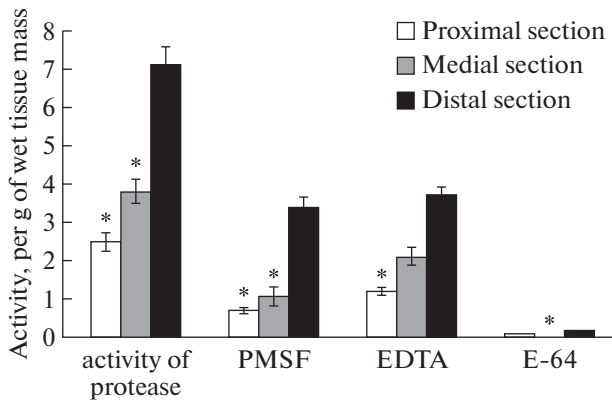


Рис. 2. Активность протеаз вдоль тонкого кишечника атлантического глупыша. Влияние ингибиторов на активность протеаз слизистой тонкого кишечника атлантического глупыша (проксимальный, медиальный и дистальный фрагменты). PMSF – сериновые протеазы, EDTA – металлопротеазы, E-64 – цистеиновые протеазы. Сравнительный анализ результатов представлен относительно показателей дистального фрагмента ($p < 0.05$).

новых протеаз в слизистой кишечника проксимального и медиального фрагментов у птиц из группы I. У птиц из группы II во всех трех фрагментах отмечена активность цистеиновых протеаз. Не зафиксировано статистически достоверных различий между значениями активностей протеаз и их подклассов (металлопротеаз, сериновых и цистеиновых протеаз) в слизистой оболочке кишечника дистального фрагмента у птиц из групп I и II. Процентное соотношение подклассов протеаз (металлопротеазы, сериновые и цистеиновые протеазы) в дистальном фрагменте кишечника не отличалось у глупышей независимо от интенсивности инвазии (рис. 3). Доли сериновых протеаз в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника не имели достоверных различий у птиц из обеих групп. У птиц из группы II доля прочих протеаз была выше в местах локализации червей (проксимальный и медиальный фрагменты) по сравнению

с аналогичными параметрами у птиц из группы I ($p < 0.05$).

Экспериментальные исследования показали, что гомогенаты цестод *T. minor* способны ингибировать активность протеаз в слизистой оболочке тонкого кишечника атлантического глупыша. В среднем гомогенатом червей ингибируется $8.1 \pm 0.8\%$ активности протеаз, функционирующих в слизистой оболочке кишечника. В то же время при воздействии PMSF на слизистую кишечника отмечено снижение активности протеаз на $28.1 \pm 3.1\%$. По итогам изучения способности *T. minor* ингибировать активность протеаз из разных фрагментов тонкого кишечника глупыша максимальный процент инактивации гомогенатами цестод *T. minor* зарегистрирован для протеаз из слизистой дистального фрагмента кишечника (рис. 4). Согласно результатам корреляционного анализа показателей инактивации протеаз слизистой кишечника гомогенатами цестод *T. minor* и ингибитором сериновых протеаз (PMSF), выявлена слабая положительная корреляция между долей сериновых протеаз в слизистой кишечника и долей инактивации протеаз гомогенатами цестод *T. minor* ($r = 0.37$).

В ходе экспериментального исследования установлено, что гомогенаты как неполовозрелых, так и половозрелых цестод *T. minor* способны ингибировать активность трипсина (рис. 5). Регрессионный анализ и вычисленный коэффициент детерминации установили зависимость изменения степени инактивации трипсина от его концентрации в среде ($R^2 = 0.89$ для неполовозрелых червей, $R^2 = 0.85$ для половозрелых червей). Сравнение значений двух прямых регрессии показало, что ингибиторная активность цестод *T. minor* не зависела от стадии зрелости червей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования установлено, что в тонком кишечнике атлантического глупыша паразитировали ленточные черви *T. minor* с высокими показателями инвазии (ЭИ – 100%, ИИ 79–696 экз.).

Таблица 1. Характеристики групп атлантического глупыша с различными показателями заражения ленточными червями *Tetrabothrius minor*

Признаки	I группа	II группа
ИИ, экз.	79–234	368–696
СИИ, экз.	143.4 ± 25.7	$537.8 \pm 49.9^*$
Масса червей, г	0.5 ± 0.07	$1.1 \pm 0.19^*$
Масса тела глупыша, г	839.0 ± 30.2	$775.0 \pm 43.3^*$
Масса печени глупыша, г	34.8 ± 2.8	42.4 ± 1.7
Масса тонкого кишечника глупыша, г	32.2 ± 2.0	$42.4 \pm 2.6^*$
Масса слизистой тонкого кишечника глупыша, г	3.8 ± 0.23	$6.1 \pm 0.7^*$

* Достоверность различия показателей относительно показателей птиц группы I, $p < 0.05$.

Таблица 2. Активность протеаз в тонком кишечнике атлантического глупыша в зависимости от показателей заражения *Tetrabothrius minor*: группа I (ИИ 79–234 экз.) и группа II (ИИ 368–696 экз.)

Группы птиц	Фрагменты кишечника		
	Проксимальный	Медиальный	Дистальный
Общая активность протеаз, усл. ед.			
группа I	3.8 ± 0.7	6.0 ± 1.4	7.5 ± 0.8
группа II	1.7 ± 0.5*	2.3 ± 0.9*	6.5 ± 2.5
Активность сериновых протеаз, усл. ед.			
группа I	0.9 ± 0.2	1.7 ± 0.5	3.6 ± 0.9
группа II	0.5 ± 0.1*	0.8 ± 0.4*	3.0 ± 0.8
Активность металлопротеаз, усл. ед.			
группа I	2.1 ± 0.3	3.7 ± 0.9	4.1 ± 0.6
группа II	0.6 ± 0.3*	1.1 ± 0.4*	3.4 ± 1.8
Активность цистеиновых протеаз, усл. ед.			
группа I	0	0	0.12 ± 0.06
группа II	0.1 ± 0.08	0.02 ± 0.01	0.1 ± 0.03

* Достоверность различия показателей относительно показателей птиц группы I, $p < 0.05$.

В местах локализации *T. minor* в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника птиц отмечено снижение активности протеаз по сравнению с показателями дистального фрагмента. С одной стороны, этот факт (повышение активности протеаз в проксимально-дистальном направлении) может свидетельствовать о неравномерном распределении протеаз вдоль тонкого кишечника глупыша. Имеется информация о том, что распределение активности протеаз вдоль тонкого кишечника отличается у разных видов птиц и зависит от их возраста, спектра питания, сезона [8, 11–13, 15–17]. Повышение активности протеаз вдоль тонкого кишечника в проксимально-дистальном направлении отмечено у взрослых моевок и у толстоклювой (*Uria lomvia*) и тонкоклювой кайр (*U. aalge*) [8, 13]. У указанных морских птиц рыба и ракообразные составляли основу спектра питания. Но при этом у птенцов моевки, в желудках которых обнаружены только рыбные остатки, активность протеаз, напротив, уменьшалась в направлении от проксимального фрагмента к дистальному [8]. Экспериментальные исследования показали, что у миртового лесного певуна (*Dendroica coronate*), диету которого составляли насекомые, активность аминопептидазы N увеличивается в проксимально-дистальном направлении, а при кормлении его фруктами или семенами активность фермента имела максимальное значения в медиальном фрагменте кишечника [15]. В то же время активность аминопептидазы N у всеядного домашнего воробья (*Passer domesticus*) повышалась в проксимально-дистальном направлении, и такое распределение не изменялось независимо от состава диеты [16, 17].

С другой стороны, снижение активности протеаз в направлении от проксимального фрагмента к дистальному может быть связано с паразитированием цестод в передних фрагментах кишечника у глупыша. Так, у незараженных взрослых серебристых чаек (*Larus argentatus*) активность протеаз снижалась от проксимального к дистальному фрагментам кишечника, а при заражении цестодами *Tetrabothrius erostris* активность протеаз в слизистой у серебристых чаек, напротив, повышалась в проксимально-дистальном направлении [12]. При этом черви *T. erostris* паразитировали в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника серебристых чаек. При изучении взаимоотношений в системе атлантический глупыш – *T. minor* максимальные значения активности кислых и щелочных протеаз отмечены в проксимальном фрагменте, а в медиальном и дистальном фрагментах эти значения не имели достоверных различий независимо от стадии зрелости ленточных червей [5]. В представленном исследовании более низкая активность протеаз установлена в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника глупыша при инвазии *T. minor*. Эти различия в изменениях активности протеаз вдоль кишечника исследованных птиц можно объяснить тем, что показатели инвазии цестодами *T. minor* у глупышей, использованных при проведении предыдущего исследования, были значительно ниже аналогичных параметров у птиц, изученных в настоящей работе [5].

Корректное изучение влияния инвазии на активность протеолитических ферментов глупышей провести затруднительно из-за 100% заражения цестодами *T. minor*. Птиц, свободных от инвазии

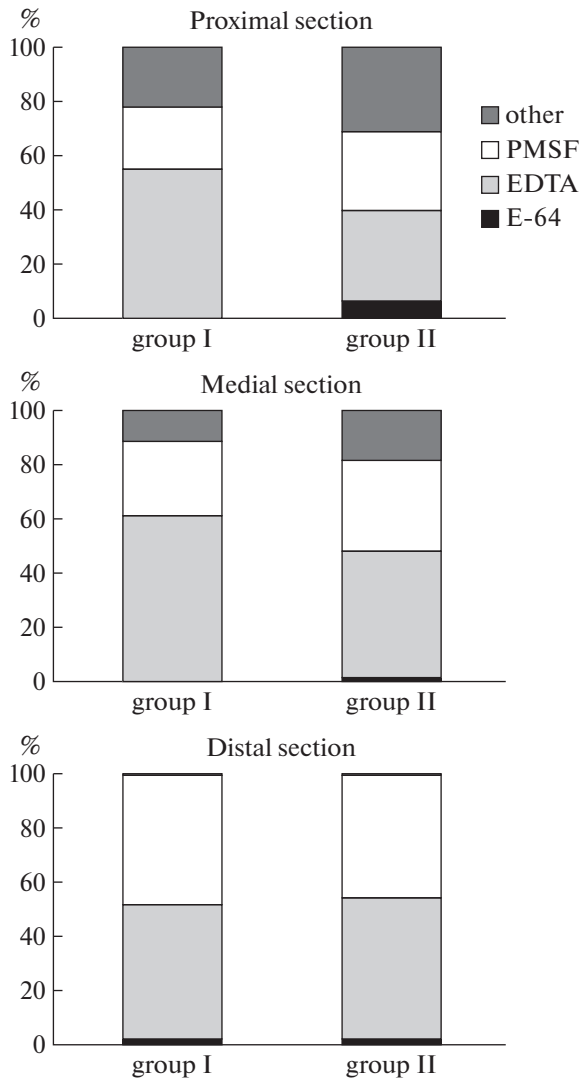


Рис. 3. Доля подклассов протеаз в слизистой оболочке тонкого кишечника (проксимального, медиального и дистального фрагментах) атлантического глупыша в зависимости от показателей заражения *Tetrabothrius minor*: группа I (ИИ 79–234 экз.) и группа II (ИИ 368–696 экз.). PMSF – сериновые протеазы, EDTA – металлопротеазы, E-64 – цистеиновые протеазы.

T. minor, обнаружено не было. В связи с этим всех исследованных глупышей разделили на 2 группы в зависимости от интенсивности инвазии (см. “Результаты”). Показано, что при высокой ИИ (368–696 экз.) снижалась активность протеаз в проксимальном и медиальном фрагментах кишечника у глупышей из группы II по сравнению со значением протеолитической активности птиц из группы I.

Снижение активности протеолитических ферментов при цестодных инвазиях неоднократно отмечалось в работах, посвященных изучению влияния заражения ленточными червями на пищеварительную активность в кишечнике окончательных хозяев – рыб и морских птиц [7–9, 11–13, 18]. При

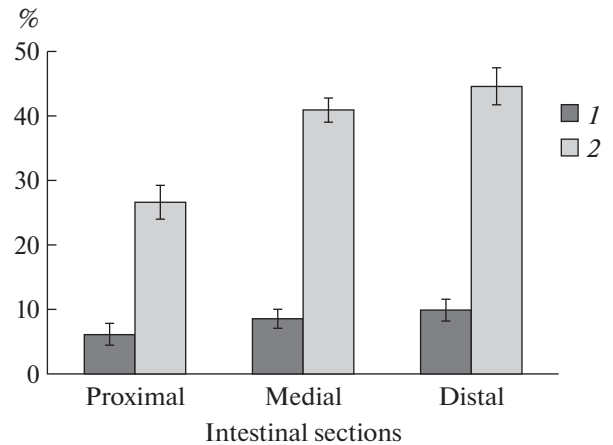


Рис. 4. Доля (%) ингибирования активности протеаз слизистой оболочки трех фрагментов тонкого кишечника атлантического глупыша гомогенатом ленточных червей 100 мкл *Tetrabothrius minor* (1) и 100 мкл PMSF (2).

заражении цестодами *T. erostris* отмечено снижение активности протеаз в местах локализации паразитов в тонком кишечнике морских птиц (взрослых моевок и их птенцов, взрослых серебристых чаек и их птенцов) [8, 11]. При заражении взрослых серебристых чаек крупной цестодой *Diphyllobothrium dendriticum* (место локализации – медиальный фрагмент) активность протеаз уменьшалась по всей длине кишечника [12]. Изменение протеолитической активности зарегистрировано авторами при изучении влияния заражения у рыб цестодами, использующих их в качестве окончательных хозяев [7, 9, 10, 18, 19]. При инвазии цестодами *Proteocephalus torulosus* у синца (*Ballerus ballerus*), *Caryophyllaeus laticeps* у леща (*Abramis brama*); *Eubothrium rugosum* у налима (*Lota lota*) уменьшались активности протеаз в слизистой кишечника. При этом показано снижение активности протеаз вдоль кишечника у налима и леща при заражении *E. rugosum* и *C. laticeps* соответственно [18, 19]. В то же время связь между распределением червей *C. laticeps* и активностью протеаз не обнаружена [18]. Установлено, что чем выше интенсивность инвазии *E. rugosum*, тем ниже активность протеаз в слизистой кишечника налима [19].

Наряду с этим показано, что, помимо снижения протеолитической активности в слизистой кишечника, при инвазии цестодами *T. minor* происходили изменения активности подклассов протеаз: уменьшение активности сериновых протеаз и металлопротеаз, а также повышение активности цистеиновых протеаз. Аналогичные результаты получены при изучении влияния инвазии *E. rugosum* и *P. torulosus* на активность подклассов протеаз из слизистой кишечника у налима и у синца соответственно [7, 9]. В местах паразитирования *C. laticeps* в слизистой кишечника у леща отмечены наиболее замет-

ные изменения по соотношению различных подклассов протеаз по сравнению с контролем [18].

Исследователи подчеркивали, что протеазы наиболее чувствительны к заражению ленточными червями, а для объяснения уменьшения активности ферментов гидролиза белков в слизистой кишечника хозяина выдвинули два предположения [7]. Первое заключается в том, что цестоды способны адсорбировать на своей поверхности ферменты хозяина. Характерной особенностью цестод заключается утрата этими животными пищеварительной системы [20]. Поглощение нутриентов через тегумент представляет собой единственный способ получения питательных веществ, необходимых для их активной жизнедеятельности. Но цестоды не только могут активно поглощать питательные вещества (аминокислоты, глюкозу и др.), но способны адсорбировать на своем тегументе ферменты хозяина [21]. Тегумент цестод содержит большое количество ферментов, что свидетельствует о его значительной роли в различных метаболических процессах. Эта группа паразитов обладает механизмом мембранного пищеварения и активного транспорта. Ранее установлено, что на тегументе *T. minor*, паразитирующих в тонком кишечнике атлантического глупыша, протекают процессы мембранного пищеварения с участием щелочных и кислых протеаз [5]. В связи с этим можно предположить, что снижение активности протеаз в проксимальном и медиальном фрагментах тонкого кишечника глупыша объясняется этим фактом. Цестоды *T. minor* адсорбируют на своей поверхности протеазы глупыша, тем самым уменьшают активность протеаз хозяина в местах локализации.

Второе предположение сводится к тому, что снижение активности протеаз в слизистой кишечника в местах локализации *T. minor*, а также при увеличении интенсивности инвазии этими цестодами может быть связано со способностью червей ингибировать активность протеаз. По результатам настоящего исследования установлено, что цестоды *T. minor* инактивировали активность протеаз слизистой оболочки кишечника глупыша и коммерческого трипсина. При этом процент ингибирования активности цестодами *T. minor* невысок по сравнению с аналогичной способностью других видов червей [22]. Так, например, гомогенат ленточных червей *T. erostris* из кишечника серебристых чаек и моевок инактивировал трипсин на $79.0 \pm 2.1\%$, а гомогенат *T. minor* из кишечника глупышей — в среднем на $45.3 \pm 2.3\%$. Аналогичная тенденция прослеживалась и при ингибировании активности протеаз из слизистой кишечника птиц: гомогенат *T. erostris* ингибировал в среднем на $25.2 \pm 0.3\%$, гомогенат *T. minor* — на $8.1 \pm 0.8\%$. Низкая способность гомогената *T. minor* ингибировать активность протеаз из слизистой и активность трипсина могут быть связаны с тем, что система атлантический глупыш — *T. minor* обладает устойчивым равнове-

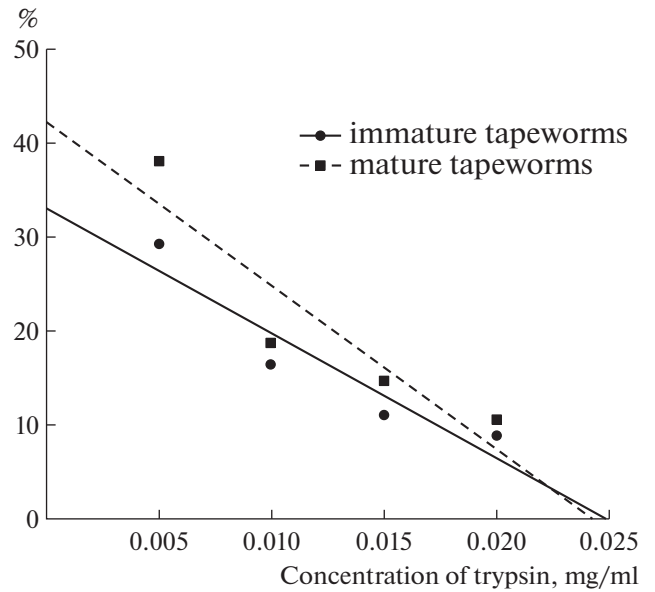


Рис. 5. Ингибирование активности трипсина в зависимости от его концентрации гомогенатами неполовозрелых (100 мкл) и половозрелых (100 мкл) червей *Tetrabothrius minor*.

сием. Во-первых, *T. minor* представляет собой специфического паразита атлантического глупыша, полностью доминирующего в его цестодофауне, и практически не встречается у других птиц из баренцевоморского региона [2]. Во-вторых, интенсивность инвазии глупышей этими ленточными червями, как правило, очень высока (до 1531 экз.) [2]. Соответственно, высокая интенсивность заражения, узкая специфичность к окончательному хозяину и отсутствие конкуренции со стороны других видов цестод могут определять невысокую ингибиторную активность гомогената *T. minor*.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что в местах локализации *T. minor* (проксимальных и медиальных фрагментах тонкого кишечника) протеолитическая активность снижена за счет уменьшения активности сериновых протеаз и металлопротеаз. Обнаружено, что чем выше интенсивность инвазии *T. minor*, тем ниже активность протеаз, в том числе металлопротеаз и сериновых протеаз. Отмечены способность гомогенатов *T. minor* ингибировать активность протеаз из слизистой оболочки глупыша и активность коммерческого трипсина разной концентрации.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ММБИ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы (М.М.К.), планирование экспериментов (М.М.К.), сбор данных (М.М.К., В.В.К.), обработка данных (М.М.К., В.В.К.), написание и редактирование манускрипта (М.М.К., В.В.К.).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность научному сотруднику ММБИ РАН А.В. Ежову за помощь в сборе материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белопольский ЛО (1957) Экология морских колониальных птиц Баренцева моря. М.; Л.: Изд-во РАН 460 с. [*Belopolyski LO* (1957) Ecology of marine colonial birds of the Barents Sea. M., L.: Publ. PAS. 460 p. (In Russ.)].
2. Kuklin VV, Kuklina MM, Ezov AV (2018) Helminths of the Barents Sea Northern Fulmar (*Fulmarus glacialis*, Procellariiformes, Procellariidae): Composition, Impact on Host, and Indicator Properties. *Biology Bulletin* 46: 804–813. <https://doi.org/10.1134/S1062359019080077>
3. Гаврило МВ, Тертицкий ГМ, Покровский ИВ, Головкин АН (1994) Орнитофауна архипелага. Среда обитания и экосистемы Земли Франца-Иосифа (Архипелаг и шельф). Апатиты: Изд. КНЦ РАН: 204–211. [*Gavrilov MV, Teritski GM, Pokrovski IV, Golovkin AN* (1994) Ornithofauna of the archipelago. Habitat and ecosystems of Franz Josef Land (Archipelago and shelf). Apatity: Publ. KSC RAS: 204–211. (In Russ.)].
4. Anker-Nilssen T, Bakken V, Strøm H, Golovkin AN, Bianki VV, Tatarinkova IP (2000) The status of marine birds breeding in the Barents Sea Region. Tromsø: Norsk Polarinstitut. 216 p. <https://doi.org/10.2307/1522196>
5. Куклина ММ (2015) Взаимоотношения в системе “атлантический глупыш *Fulmarus glacialis* – цестода *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae)”: физиологические аспекты. *Паразитология* 49: 433–443. [*Kuklina MM* (2015) Relationships in the “northern fulmar *Fulmarus glacialis* – *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae)” system: physiological aspects. *Parasitology* 49: 433–443. (In Russ.)].
6. Извекова ГИ, Куклина ММ (2014) Заражение цестодами и активность пищеварительных гидролаз позвоночных хозяев. *Успехи современной биологии* 134 (3): 304–315. [*Izvekova GI, Kuklina MM* (2014) Infection with cestodes and the activity of digestive hydrolases of vertebrate hosts. *Successes of modern biology* 134 (3): 304–315. (In Russ.)].
7. Фролова ТВ, Извекова ГИ (2018) Влияние заражения цестодой *Proteocephalus torulosus* Batsch, 1786 на активность ферментов в кишечнике синца (*Ballerus ballerus*). *Паразитология* 52: 292–303. [*Frolova TV, Izvekova GI* (2018) The influence of cestode infection with *Proteocephalus torulosus* Batsch, 1786 on the enzyme activity in the intestine of the zope (*Ballerus ballerus*). *Parasitology* 52: 292–303. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.7868/S0031184718040042>
8. Kuklina MM, Kuklin VV (2018) Effect of Cestodal Infestation on the Distribution Pattern of Digestive Enzyme Activities along the Small Intestine of the Kittiwake (*Rissa tridactyla*). *J Evol Biochem Physiol* 54: 292–299. <https://doi.org/10.1134/S0022093018040051>
9. Izvekova GI, Solovyev MM (2016) Characteristics of the Effect of Cestodes Parasitizing the Fish Intestine on the Activity of the Host Proteinases. *Biol Bull* 43 (2): 146–151. <https://doi.org/10.1134/S1062359016010076>
10. Frolova TV, Izvekov EI, Solovyev MM, Izvekova GI (2019) Activity of proteolytic enzymes in the intestine of bream *Abramis brama* infected with cestodes *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidae). *Compar Biochem Mol Biol Part B* 235: 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2019.05.009>
11. Kuklina MM, Kuklin VV (2016a) *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda: Diphyllobothriidae) in the intestinal tract of the herring gull *Larus argentatus*: Localization and trophic parameters. *Biol Bull* 43: 329–334. <https://doi.org/10.1134/S1062359016040063>
12. Kuklina MM, Kuklin VV (2016b) The activities of digestive enzymes as a determinant factor in the localization of *Tetrabothrius erostris* (Loennberg) (Cestoda: Tetrabothriidae) in the intestine of the herring gull *Larus argentatus* Pontoppidan. *Inland Water Biol* 9: 189–195. <https://doi.org/10.1134/S1995082916010107>
13. Kuklina MM, Kuklin VV (2022) Activity of Digestive Enzymes in the Small Intestine of the Common and Thick-Billed Murres: Effect of Dietary Composition and Helminth Infection. *J Evol Biochem Physiol* 58: 1785–1794. <https://doi.org/10.31134/S0022093022060102>
14. 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. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00087-X)
15. Afik DL, Caviedes-Vidal E, Martínez del Rio C, Karasov WH (1995) Dietary modulation of intestinal hydrolytic enzymes in yellow-rumped warblers. *Am J Physiol* 269: 420–423. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1995.269.2.R413>
16. Caviedes-Vidal E, Afik D, Martínez del Rio C, Karasov WH (2000) Dietary modulation of intestinal enzymes of the house sparrow (*Passer domesticus*): testing an adaptive hypothesis. *Compar Biochem Physiol Part A* 125: 11–24. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00163-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00163-4)
17. Chediack JG, Furrer SC, Cid FD, Filippa V, Caviedes-Vidal E (2012) Effect of fasting on the structure and function of the gastrointestinal tract of house sparrows (*Passer domesticus*). *Compar Biochem Physiol Part A* 163: 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.05.189>
18. Izvekova GI, Solovyov MM, Izvekov EI (2011) Effect of *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidae) upon Activity of Digestive Enzymes in Bream. *Biol Bull* 38: 50–56. <https://doi.org/10.1134/S1062359011010055>

19. *Izvekova GI* (2013) Activity of digestive enzymes in burbots *Lota lota* (Linnaeus) depending on their infestation with *Eubothrium rugosum* (Batch) (Cestoda, Pseudophyllidea). *Inland Water Biol* 6 (1): 57–61.
<https://doi.org/10.1134/S1995082913010069>
20. *Dalton JP, Skelly P, Halton DW* (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>
21. *Izvekova GI, Frolova TV, Izvekov EI* (2017) Adsorption and inactivation of proteolytic enzymes by *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda). *Helminthologia* 54 (1): 3–10.
<https://doi.org/10.1515/helm-2017-0001>
22. *Izvekova GI, Kuklina MM, Frolova TV* (2017) Inactivation of proteolytic enzymes by cestodes. *Dokl Biol Sci* 475: 161–164.
<https://doi.org/10.1134/S0012496617040081>

PROTEASE ACTIVITY IN THE SMALL INTESTINE OF THE NORTHERN FULMAR *FULMARUS GLACIALIS* BY INFECTION OF *TETRABOTHRIUS MINOR* (CESTODA: TETRABOTHRIIDAE)

© 2023 г. М. М. Kuklina^{a, #} and V. V. Kuklin^a

^a*Murmansk Marine Biological Institute of the Russian Academia Science, Murmansk, Russia*

[#]*e-mail: MM_Kuklina@mail.ru*

The effect of infection of *Tetrabothrius minor* (Cestoda: Tetrabothriidae) on the protease activity of the mucous membrane of the small intestine of the Northern Fulmar *Fulmarus glacialis* was studied. Aspects of changes in the activity of proteases and protease subclasses (metalloproteases, serine proteases and cysteine proteases) by infection of *T. minor*, and the ability of *T. minor* to inactivate proteases from the intestinal mucosa and commercial trypsin were evaluated. It has been established that in the localization of *T. minor* (proximal and medial sections of the small intestine) decreased protease activity due to a decrease in the activity of serine proteases and metalloproteases. The dependence of the decrease of protease activity in the mucous membrane of the small intestine of the host on the parameters of infection with cestodes was found – the higher the infection intensity of *T. minor*, the lower the activity of proteases, including metalloproteases and serine proteases. The ability of *T. minor* homogenates to inhibit the activity of proteases from the mucosa of Northern Fulmar and the activity of commercial trypsin of different concentrations was noted.

Keywords: *Tetrabothrius minor*, *Fulmarus glacialis*, protease activity, trypsin, serine proteases, inhibition