

УДК 595.121:577.15

**НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИНГИБИРОВАНИЯ
АКТИВНОСТИ ТРИПСИНА ЦЕСТОДАМИ *TRIAENOPHORUS
NODULOSUS* И *EUBOTHRIUM RUGOSUM***

© 2019 г. Г. И. Извекова*, Т. В. Фролова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН,

Борок, Ярославская обл., 152742 Россия

* e-mail: izvekov@ibiw.yaroslavl.ru

Поступила 28.11.2018 г.

Исследовано влияние экстрактов цестод *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) и *Eubothrium rugosum* (Batsch, 1786), обитающих в кишечниках щуки и налима соответственно, на активность коммерческого препарата трипсина. Установлено, что добавление этих экстрактов приводит к немедленному достоверному снижению активности раствора трипсина. Уровень влияния экстрактов зависит от их разведения. Чем меньше разведение экстракта червей, тем выше уровень ингибирования активности трипсина. В то же время масса червей не оказывает достоверного влияния на их ингибирующий эффект. Ингибиторы протеиназ защищают исследованных цестод от деструктивного воздействия протеолитических ферментов хозяев.

Ключевые слова: цестоды, протеолитические ферменты, трипсин, ингибиторы протеиназ.

DOI: 10.1134/S0031184719010071

Все паразитические организмы в течение жизненного цикла сталкиваются со сходными проблемами. Им необходимо проникнуть в другую среду, преодолев тканевую барьер, получить необходимые для развития питательные вещества и избежать иммунного ответа хозяина. Кроме этого, несмотря на весьма выгодное в отношении доступности питательных веществ окружение, цестодам, обитающим в кишечнике позвоночных животных, необходимо защититься от постоянного действия протеолитических ферментов их хозяев. Один из главных механизмов защиты от протеиназ хозяина – секреция паразитами ингибиторов этих ферментов, которые способны эффективно инактивировать протеиназы в их среде обитания (Hawley, Peanasky, 1992). Ингибиторы протеиназ, так же как и сами протеиназы, играют важную роль в жизненном цикле паразитов, их вирулентности и патогенезе (Rascón, McKerrow, 2013). Большое количество выделенных и описанных ингибиторов протеиназ имеет белковое происхождение, а большинство известных и охарактеризованных белковых ингибиторов относятся к группе ингибиторов сериновых протеиназ (Molehin et al., 2012).

Большое количество работ посвящено исследованию ингибиторов протеиназ у различных видов нематод (обзор: Кпox, 2007). Работ, касающихся ингибиторов протеиназ у цестод, немного, список исследованных видов невелик (Извекова, Фролова, 2016), существенная их часть посвящена эпидемиологически значимым представителям родов *Taenia* Linnaeus, 1758 и *Echinococcus* Rudolphi, 1801 (Leid et al., 1987a, b; Shepherd et al., 1991; Merckelbach, Ruppel, 2007; González et al., 2009). Известно, что ингибиторы сериновых протеиназ – один из ключевых компонентов среди секреторных

продуктов многих видов паразитов (Merckelbach, Ruppel, 2007; González et al., 2009). У цестод к настоящему времени установлено существование только ингибиторов сериновых протеиназ – трипсина и химотрипсина. Трипсин – протеолитический фермент, один из основных ферментов пищеварения, он катализирует гидролитическое расщепление белков и пептидов. Трипсин обнаружен у всех позвоночных животных; кроме того, у многих беспозвоночных, растений и микроорганизмов найден фермент, аналогичный трипсину (Диксон, Узбб, 1982).

Работ, посвященных способности обитающих в кишечнике рыб цестод ингибировать протеиназы хозяина, крайне мало. Есть сведения, что неповрежденная цестода *Proteocephalus longicollis* (Zeder, 1800) из лососевых рыб секретировать в среду ингибитор трипсина (Reichenbach-Klinke, Reichenbach-Klinke, 1970). Установлено, что экстракты, приготовленные из личинок и взрослых червей *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934, угнетали трипсиновую и химотрипсиновую активность кишечника карпа *in vitro* (Matskási, 1984). В серии наших работ показана способность взрослых цестод, обитающих в кишечнике некоторых видов рыб, ингибировать активность трипсина и активность протеиназ гомогената слизистой оболочки кишечника их хозяев, и определены условия осуществления этой способности (Извекова и др., 2017; Izvekova et al., 2017 a, b).

Triaenophorus nodulosus (Pallas, 1781) – часто встречающийся и широко распространенный вид рода *Triaenophorus*. Этот вид цестод отмечен почти во всех водоемах Европы, Сибири и Северной Америки, где обитает его окончательный хозяин – щука (Куперман, 1988).

Eubothrium rugosum (Batsch, 1786) – специфичный паразит налима, обитающий в его кишечнике. Головной конец червей прикрепляется в пилорических придатках кишечника налима, а стробила выходит в его среднюю часть. Значительная часть червей способна после частичной дестробиляции полностью регенерировать и достигать половой зрелости в кишечнике налима (Куперман, 1988).

Цель работы – исследовать некоторые особенности ингибирования экстрактами цестод *Triaenophorus nodulosus* и *Eubothrium rugosum* активности трипсина – одного из основных пищеварительных ферментов, функционирующего в кишечнике хозяев-рыб.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследований служили цестоды *Triaenophorus nodulosus* и *Eubothrium rugosum* из кишечника щуки *Esox lucius* (L.) и налима *Lota lota* (L.), соответственно. Исследованы черви из 5 щук и 12 налимов, выловленных в Рыбинском водохранилище. Кишечники рыб вскрывали, извлекали червей и 3 раза тщательно промывали в 10 мл раствора Рингера (6 г NaCl; 0.14 г KCl; 0.5 мл 10 % CaCl₂; 0.54 г Na₂HPO₄; 0.02 г KH₂PO₄; 0.16 г MgSO₄ в 1 л дистиллированной воды), pH 7.5 для холоднокровных животных с целью удаления ферментов хозяина. Из каждой щуки извлекали по 2–4 червя массой 0.25 ± 0.03 г, из каждого налима – по 1–5 червей массой 0.64 ± 0.07 г. Вскрытие рыб, их кишечников, извлечение червей и приготовление препаратов производили на ледяной бане.

Подготовка экстракта червей

Извлеченных из кишечников и отмытых, как описано выше, червей гомогенизировали и гомогенат разводили раствором Рингера в различных соотношениях в зависимости от поставленных задач. Для исследования зависимости ингибиторной способности червей от времени действия на трипсин гомогенат разводили в соотношении

масса-объем 1 : 9. Это разведение было определено как оптимальное при исследовании ингибирующей способности червей в предыдущих опытах (Izvekova et al., 2017a, b). Гомогенаты готовили с помощью стеклянных гомогенизаторов фирмы Sartorius AG (Германия). Гомогенаты червей центрифугировали при 6500 г в течение 5 мин при 4 °С. Экстракты червей (супернатант), полученные после центрифугирования их гомогенатов, замораживали до дальнейшего использования.

Для исследования влияния разведения источника ингибитора на активность трипсина гомогенат червей разводили в соотношении масса-объем 1 : 4 (5 раз), центрифугировали, как указано выше, и из супернатанта готовили разведения 10, 20, 30, 40, 50 и 80 раз. Таким способом получали различные разведения растворенных в растворе Рингера экскреторно-секреторных продуктов. Для исследования влияния массы червей на активность трипсина гомогенат готовили из расчета 0,1, 0,25 и 0,5 г в 2 мл раствора Рингера и центрифугировали, как описано выше, т.е. исследовали выделение экскреторно-секреторных продуктов червями разной массы в один и тот же объем раствора Рингера.

Определение ингибирующей способности червей

При определении ингибирующей способности червей источником протеиназ служил коммерческий препарат трипсина (Т4799, Sigma) в концентрации 0,01 мг/мл в трис-буфере (рН 7,5). Для определения ингибирующей способности в опытную среду, содержащую 200 мкл раствора трипсина, добавляли 20 мкл экстракта червей. Время инкубации трипсина с ингибитором менялось в зависимости от поставленных задач. В экспериментах по определению влияния разведения экстракта и массы червей на активность трипсина время инкубации составляло 15 мин. При определении влияния времени действия ингибитора на активность трипсина время инкубации составляло 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин. Одновременно в соответствующую контрольную пробу добавляли аналогичный объем буфера. После инкубации в пробах определяли протеолитическую активность. Оптимальные концентрации трипсина и экстракта червей установлены ранее в специальных экспериментах (Izvekova et al., 2017 a, b).

Определение протеолитической активности

Активность трипсина определяли с использованием в качестве субстрата 0,3 % азо-казеина в трис-буфере, рН 7,5 (Alarcón et al., 2002). Субстрат и ферментативно активный препарат инкубировали 60 мин при 20–22 °С. Реакцию останавливали добавлением 400 мкл 0,3 М раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), образовавшийся осадок из негидролизованного белка удаляли центрифугированием при 6500 г в течение 5 мин. Интенсивность развивающегося окрашивания, пропорционального активности фермента, измеряли в супернатанте при 440 нм на спектрофотометре Lambda 25 (PerkinElmer).

Единицы протеиназной активности (ЕА) вычисляли по формуле:

$$EA = \Delta / m \times T,$$

где Δ – разница показаний спектрофотометра пробы с субстратом и холостой пробы (при 440 нм); m – масса раствора трипсина, г; T – время инкубации, мин

Статистическая обработка

Результаты представлены в виде средних и их стандартных ошибок. Обработка результатов выполнена с помощью программы Microsoft Excel 2010 и статистического

пакета STATISTICA 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Ингибиторный эффект оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа с использованием критерия Тьюки для множественного сравнения средних значений при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование активности трипсина в концентрации 0.01 мг/мл через каждые 5 мин показало, что она достоверно ($p < 0.05$) уменьшается через 10 мин; в течение следующих 20 мин активность несколько снижается, но изменения ее уровня недостоверны (рис. 1, А). Инкубирование трипсина с одним и тем же объемом (20 мкл) экстракта цестод в течение различных промежутков времени приводит к достоверному ($p < 0.05$) снижению его активности (рис. 1, А). При этом ингибирование активности трипсина происходит немедленно после добавления экстракта цестод и уровень его активности в течение последующих 30 мин значительно не изменяется. Не отмечено достоверных различий между активностью трипсина при добавлении экстрактов *T. nodulosus* или *E. rugosum* (рис. 1, А). В то же время доля ингибирования трипсина экстрактом *T. nodulosus* составила от 73.1 до 79.7 % в зависимости от времени инкубации, а доля ингибирования фермента при действии экстракта *E. rugosum* – от 54.2 до 58.7 % (рис. 1, Б).

Разведение экстрактов *T. nodulosus* и *E. rugosum* показало, что чем меньше разведен экстракт червей, тем больший эффект ингибирования он оказывает на активность трипсина (рис. 2, А). Достоверное влияние достигается при разведении экстракта *T. nodulosus* в 50 раз и меньше, а экстракта *E. rugosum* в 40 раз и меньше. При этом влияние экстракта *T. nodulosus* достоверно сильнее, чем такового *E. rugosum* при разведениях от 20 до 80 раз ($p < 0.05$). При разведении в 5–10 раз действия экстрактов этих цестод достоверно не различаются. С увеличением разведения влияние экстракта *T. nodulosus* падает медленнее, чем экстракта *E. rugosum*. Доля ингибирования при различных разведениях для экстракта *T. nodulosus* составила 43.9–87.4 %, а для такового *E. rugosum* – 12.4–71.3 % (рис. 2, Б).

Приготовление экстрактов червей из расчета 0.1, 0.25 и 0.5 г в 2 мл раствора Рингера показало, что их масса не оказывает достоверного влияния на ингибирующий эффект исследованных цестод (рис. 3, А). Также достоверно не отличалось влияние на активность трипсина экстрактов *T. nodulosus* и *E. rugosum* в этих условиях эксперимента. При этом доля ингибирования активности трипсина составила 73.6–77.7 % и 82.8–88.3 % для экстрактов *T. nodulosus* и *E. rugosum*, соответственно (рис. 3, Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что при заражении цестодами в кишечнике их хозяев-рыб изменяются активность и спектр протеиназ, причем основные изменения общей протеолитической активности у зараженных рыб происходят за счет сериновых протеиназ (Извекова, Соловьев, 2016). Было высказано предположение, что эти изменения в частности могут быть обусловлены адсорбцией ферментов хозяина на поверхности цестод и их ингибированием. Позже это предположение подтвердилось, и была показана способность экстрактов цестод *T. nodulosus* и *E. rugosum* ингибировать активность трипсина и активность протеиназ гомогената слизистой оболочки кишечника их хозяев (Izvekova et al., 2017 a, b). Было установлено, что доля ингибирования трипсина в концентрации 0.01 мг/мл экстрактами как *T. nodulosus*, так и *E. rugosum*, составляет около 80 % (Izvekova et al., 2017 a, b). Это позволило использовать трипсин указанной концентрации в качестве основной концентрации при исследовании различных условий

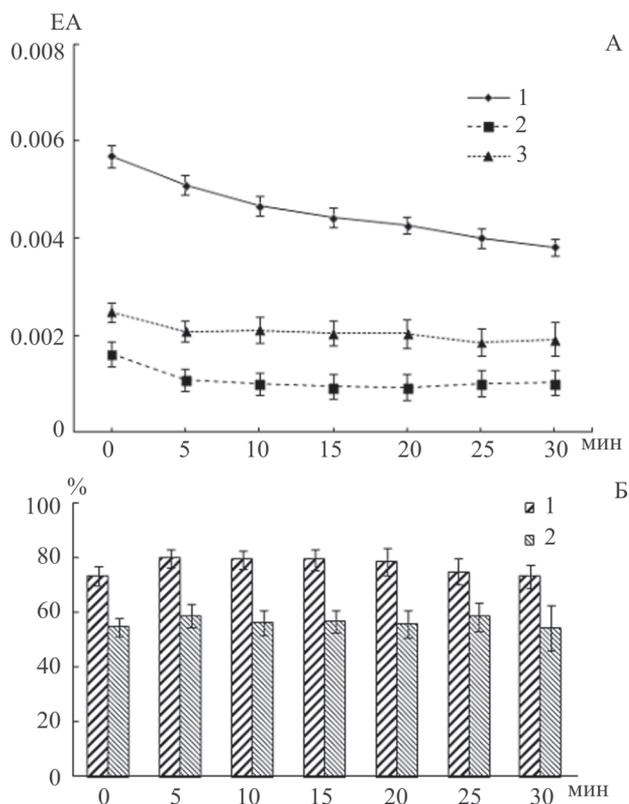


Рис. 1. А – активность трипсина (0.01 мг/мл) через различные промежутки времени (1) и влияние на его активность экстракта цестод *T. nodulosus* (2) и *E. rugosum* (3). По горизонтали – время, мин; по вертикали – единицы протеиназной активности, ЕА. Б – доля (%) ингибирования активности трипсина экстрактом цестод *T. nodulosus* (1) и *E. rugosum* (2) через различные промежутки времени. По горизонтали – время, мин; по вертикали – доля ингибирования, %.

его ингибирования экстрактами цестод. В настоящей работе мы предприняли попытку определить условия, при которых экстракты исследованных цестод ингибируют активность трипсина.

В наших экспериментах установлено, что трипсин различных концентраций ингибируется экстрактом не полностью, но в достаточно высокой мере, что защищает паразита от протеолиза. Поскольку ингибирование трипсина экстрактами цестод происходило немедленно после их добавления к раствору фермента, а черви предварительно не содержались в этом растворе, можно предположить, что выделение ингибиторов не индуцируется присутствием протеиназ в среде, а их синтез осуществляется паразитом постоянно. Аналогичное предположение было сделано при исследовании растворимой фракции изолированной щеточной каймы тегумента *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819) (Pappas, Uglem, 1990). Попытки определить ингибиторную способность щеточной каймы тегумента *H. diminuta* позволили установить, что изолированная мембрана ее тегумента неустойчива к действию протеолитических ферментов и так же, как нерастворимая фракция изолированной щеточной каймы, не ингибирует бычий трипсин. Однако растворимая фракция изолированной щеточной каймы тегумента

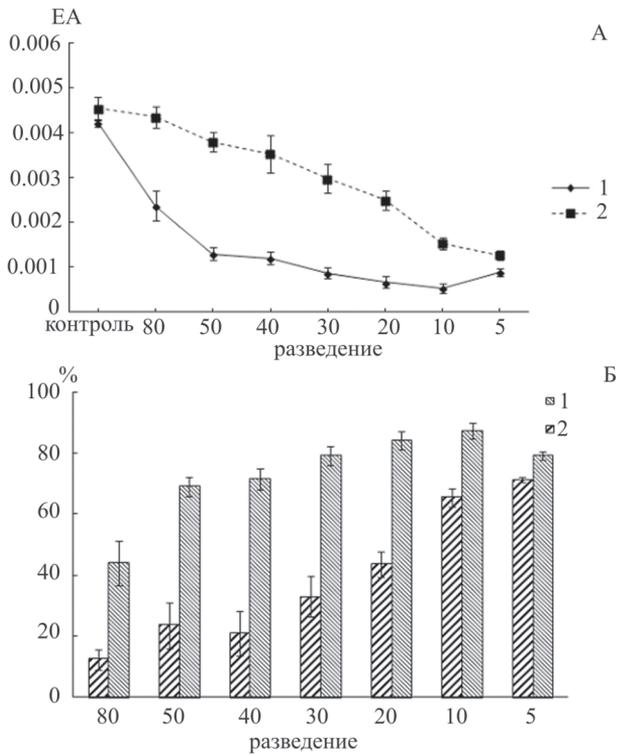


Рис. 2. А – влияние различного разведения экстрактов *T. nodulosus* (1) и *E. rugosum* (2) на активность трипсина.

По горизонтали – разведение; по вертикали: единицы протеиназной активности, ЕА. Б – доля (%) ингибирования трипсина экстрактом цестод *T. nodulosus* (1) и *E. rugosum* (2) при различном разведении. По горизонтали – разведение; по вертикали – доля ингибирования, %.

H. diminuta содержит вещества, ингибирующие протеолитическую и амидазную активность бычьего трипсина и некоторые протеолитические ферменты тонкого кишечника хозяина; кроме того, выделение ингибитора не индуцируется присутствием протеиназ в среде (Pappas, Uglem, 1990).

Исследование влияния экстракта червей на активность трипсина различной концентрации также показывает, что продуцируемый цестодами ингибитор не обеспечивает 100 % инактивацию трипсина (Izvekova et al., 2017 a, b). При действии экстракта червей активность всех исследованных концентраций трипсина снижалась, при этом уровень активности фермента практически не зависел от его концентрации, но повышалась доля ингибирования трипсина, т.е. увеличивалось абсолютное количество ингибируемого фермента. Было высказано предположение о зависимости ингибирующей способности экстракта червей от концентрации трипсина (Izvekova et al., 2017 b). Высокая степень ингибирования трипсина экстрактами цестод в наших экспериментах подтверждает имеющиеся сведения о важной роли ингибиторов протеиназ в жизненном цикле паразитов (Rascón, McKerrow, 2013). Они продуцируются червями для предотвращения гидролиза протеиназами хозяина и выживания в его кишечнике и, по мнению некоторых авторов, вносят вклад в специфичность паразитирования (Hawley, Peanasky, 1992).

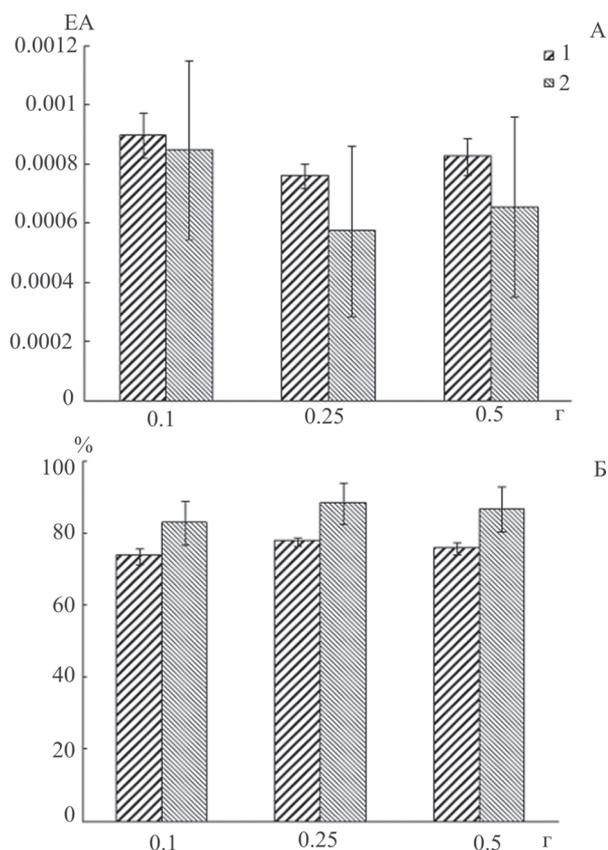


Рис. 3. А – активность трипсина в зависимости от массы *T. nodulosus* (1) и *E. rugosum* (2).

По горизонтали – масса, г; по вертикали – единицы протеиназной активности, ЕА. Б – доля (%) ингибирования трипсина экстрактом *T. nodulosus* (1) и *E. rugosum* (2) в зависимости от массы червей.

По горизонтали – масса, г; по вертикали – доля ингибирования, %.

Согласно классическим представлениям об ингибировании активности ферментов, различают необратимое и обратимое ингибирование (Диксон, Уэбб, 1982). При этом обратимое ингибирование характеризуется равновесием между ферментом и ингибитором. Степень ингибирования зависит от концентрации ингибитора, достигается довольно быстро, после чего уже не зависит от времени. Исходя из этих сведений и полученных нами данных (ингибирование активности трипсина произошло немедленно после добавления экстракта цестод, и затем уровень его активности значительно не изменялся), можно сделать предположение, что в экстрактах исследованных цестод содержится ингибитор трипсина, взаимодействующий с ним по типу обратимого ингибирования. Однако известно, что реакции захвата фермента ингибитором никогда не являются действительно обратимыми, поскольку немодифицированный ингибитор не подвергается восстановлению (Диксон, Уэбб, 1982). Исследования ингибирующей способности экстрактов цестод *T. nodulosus* и *E. rugosum* показали ее зависимость от концентрации, быстрое взаимодействие с ферментом и независимость от времени взаимодействия. Это согласуется с данными, полученными при исследовании ингибирующей способности других гельминтов. Так, зависимость от концентрации экстрактов *Taenia taeniaformis* Batsch, 1786 обнаружена при исследовании способности

этих экстрактов ингибировать активность трипсина и химотрипсина (Suquet et al., 1984). Также от концентрации ингибитора сериновых протеаз SmSPI, обнаруженного у *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, зависел уровень ингибирования химотрипсина (Pakchotanon et al., 2016).

Ранее в экстрактах половозрелых червей и в инкубационной среде плероцеркоидов *Taenia pisiformis* Bloch 1780, содержащихся *in vitro*, обнаружен ингибитор протеиназ (Németh et al., 1979). Ингибирующая способность проявлялась по отношению к трипсину и химотрипсину быка, собаки и кролика. Однако этот ингибитор не влиял на гидролитическую активность субтилизина, эластазы, коллагеназы, пепсина, ренина и папаина. Кроме того, установлено образование комплекса между трипсином и химотрипсином и ингибитором, происходящее за 3–4 мин (Németh et al., 1979; Németh, Juhász, 1981), что вполне согласуется с полученными нами данными для экстрактов *T. nodulosus* и *E. rugosum*, при использовании которых в качестве источника ингибитора трипсина, инактивация последнего наступала сразу после добавления экстрактов цестод.

Взаимодействие паразит-хозяин обеспечивается комплексом различных веществ, продуцируемых обоими партнерами. Известно, что в жизненном цикле гельминтов протеазы играют ключевую роль при проникновении через тканевой барьер и уклонении от иммунного ответа хозяина. При этом продуцируемые паразитом ингибиторы могут защищать их от протеолитических ферментов хозяина или регулировать активность собственных эндогенных ферментов (McKerrow et al., 2006).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что добавление экстрактов цестод *T. nodulosus* и *E. rugosum* приводит к немедленному достоверному снижению активности раствора коммерческого препарата трипсина. Чем больше концентрация экстракта червей (т.е. чем меньше разведен экстракт), тем больший эффект ингибирования он оказывает на активность трипсина. Масса червей не оказывает достоверного влияния на ингибирующую способность исследованных цестод. Доля ингибирования трипсина экстрактами червей зависит от условий эксперимента, превышая в некоторых случаях 80 %. Наличие ингибиторов протеиназ необходимо обитающим в кишечнике цестодам для защиты от постоянного воздействия протеолитических ферментов хозяина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИБВВ РАН (тема № ААА-А18-118012690100-5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Диксон М., Уэбб Э. 1982. Ферменты. Москва, Мир, 1118 с.
- Извекова Г. И., Соловьев М. М. 2016. Особенности влияния цестод, паразитирующих в кишечнике рыб, на активность протеиназ хозяев. Известия РАН. Серия биологическая **2**: 182–187.
- Извекова Г. И., Фролова Т. В. 2016. Протеолитические ферменты и их ингибиторы у цестод. Успехи современной биологии **136** (4): 404–416.
- Извекова Г. И., Куклина М. М., Фролова Т. В. 2017. Инактивация протеолитических ферментов цестодами. Доклады Академии Наук **475** (4): 469–472.
- Куперман Б. И. 1988. Функциональная морфология низших цестод. Ленинград, Наука, 168 с.
- 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 ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology **32**: 265–274.

- González S., Fló M., Margenat M. Durán R., González-Sapienza G., Graña M., Parkinson J., Maizels R. M., Salinas G., Alvarez B., Fernández C. 2009. A family of diverse Kunitz inhibitors from *Echinococcus granulosus* potentially involved in host-parasite cross-talk. *PLoS ONE* **4** (9): e7009.
- Hawley J. H., Peanasky A. J. 1992. *Ascaris suum*: Are trypsin inhibitors involved in species specificity of ascarid nematodes? *Experimental Parasitology* **75**: 112–118.
- Izvekova G. I., Frolova T. V., Izvekov E. I. 2017a. Adsorption and inactivation of proteolytic enzymes by *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda). *Helminthologia* **54** (1): 3–10.
- Izvekova G. I., Frolova T. V., Izvekov E. I. 2017b. Inactivation of proteolytic enzymes by *Eubothrium rugosum* (Batsch, 1786) (Cestoda) from the gut of burbot *Lota lota* (Linnaeus). *Folia Parasitologica* **64**: 016.
- Knox D. P. 2007. Proteinase inhibitors and helminth parasite infection. *Parasite Immunology* **29**: 57–71.
- Leid R. W., Grant R. F., Suquet C. M. 1987a. Inhibition of equine neutrophil chemotaxis and chemokinesis by a *Taenia taeniaeformis* proteinase inhibitor, taeniaestatin. *Parasite Immunology* **9** (2): 195–204.
- Leid R. W., Grant R. F., Suquet C. M. 1987b. Inhibition of neutrophil aggregation by taeniaestatin, a cestode proteinase inhibitor. *International Journal for Parasitology* **17** (7): 1349–1353.
- Matskási I. 1984. The effect of *Bothriocephalus acheilognati* infection on the protease and α -amylase activity in the gut of carp fry. *Symposia Biologia Hungarica* **23**: 119–125.
- McKerrow, J. H. Caffrey C., Kelly B., Loke P., Sajid M. 2006. Proteases in parasitic diseases. *Annual Review of Pathology* **1**: 497–536.
- Merckelbach A., Ruppel A. 2007. Biochemical properties of an intracellular serpin from *Echinococcus multilocularis*. *Molecular Biochemical Parasitology* **156**: 84–88.
- Molehin A. J., Gobert G. N., McManus D. P. 2012. Serine protease inhibitors of parasitic helminthes. *Parasitology* **139** (6): 681–695.
- Németh I., Juhász S. 1981. Properties of a trypsin and chymotrypsin inhibitor secreted by larval *Taenia pisiformis*. *International Journal for Parasitology* **11** (2): 137–144.
- Németh I., Juhász S., Baintner K. 1979. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Taenia pisiformis*. *International Journal for Parasitology* **9** (6): 515–522.
- Pakchotanon P., Molee P., Nuamtanong S., Limpanont Y., Chusongsang P., Limsomboon J., Chusongsang Y., Maneewatcharangsri S., Chaisri U., Adisakwattana P. 2016. Molecular characterization of serine protease inhibitor isoform 3, SmSPI, from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* **115** (8): 2981–2994.
- Pappas P. W., Uglem G. L. 1990. *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) liberates an inhibitor of proteolytic enzymes during in vitro incubation. *Parasitology* **101**: 455–464.
- Rascón Jr, McKerrow J. H. 2013. Synthetic and natural protease inhibitors provide insights into parasite development, virulence and pathogenesis. *Current Medicinal Chemistry* **20**: 3078–3102.
- Reichenbach-Klinke H.-H., Reichenbach-Klinke K.-E. 1970. Enzymuntersuchungen an Fischen. II. Trypsin- und α -amylase-Inhibitoren. *Archiv für Fischereiwissenschaft* **21**: 72–76.
- Shepherd J. C., Aitken A., McManus D. P. 1991. A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Molecular and Biochemical Parasitology* **44**: 81–90.
- Suquet C., Green-Edwards C., Wes Leid R. 1984. Isolation and partial characterization of a *Taenia taeniaeformis* metacestode proteinase inhibitor. *International Journal for Parasitology* **14** (2): 165–172.

CERTAIN CHARACTERISTICS OF TRYPSIN ACTIVITY INHIBITION BY CESTODES *TRIAENOPHORUS NODULOSUS* AND *EUBOTHRIUM RUGOSUM*

G. I. Izvekova, T. V. Frolova

Key words: cestodes, proteolytic enzymes, trypsin, proteinase inhibitors.

SUMMARY

The effect of the extracts from cestodes *T. nodulosus* and *E. rugosum* inhabiting the intestines of pike and burbot, respectively, on the activity of commercial trypsin was studied. It was found that adding these extracts leads to an immediate and significant decrease in the activity of trypsin solution. The impact level of the extracts depends on their dilution. The lower the dilution of the worm extract, the higher the level of trypsin activity inhibition. At the same time, the mass of the tapeworms have no significant influence on their inhibitory effect. Proteinase inhibitors protect the studied cestodes from the destructive effects of host proteolytic enzymes.