

**СРАВНЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ
ИМАГИНАЛЬНОЙ ФАЗЫ И ПЛЕРОЦЕРКОИДОВ
SPIROMETRA ERINACEI****Э. Г. Кравцов**Кафедра биологии с общей генетикой
1-го Московского медицинского института им. И. М. Сеченова

В предыдущих работах (Кравцов, 1965, 1966) нами было показано, что стробилы ленточных червей семейства *Diphyllobothriidae* имеют определенную общность антигенной структуры. Наличие общих антигенов позволяет отдифференцировать виды этого семейства от представителей других семейств, например *Taeniidae*. В то же время было установлено, что разные виды дифиллоботриид имеют особенности в некоторых компонентах антигенного комплекса. Последнее может быть использовано в целях систематики.

Задача настоящей работы заключалась в изучении вопроса, изменяется ли антигенная структура дифиллоботриид в онтогенезе. Нам важно было выяснить, идентичны ли антигенные комплексы стробилы и плероцеркоида. Общность их позволила бы использовать иммунологические методы при решении вопроса — относится ли выделенная из окончательного хозяина стробила и полученные из промежуточного хозяина плероцеркоиды к тому же или различным видам. Следует учесть, что видовая идентификация плероцеркоидов до сих пор далеко не закончена (Чинова, Гофман-Кадошников, Кравцов, 1962).

Вопрос о тождестве или различии антигенных комплексов взрослых и личиночных форм у гельминтов остается дискуссионным. Вильгельми (Wilhelmi, 1940) считал, что антигены взрослых гельминтов и их личинок тождественны. Однако Оливер-Гонзалес (Oliver-Gonzalez, 1940, 1963) и Мелчер (Melcher, 1943), изучив антигены возрастных стадий трихинелл, пришли к выводу, что антигенная структура этих червей испытывает возрастные изменения. Учитывая сказанное, мы сравнивали антигенную структуру плероцеркоидов и стробил одного из представителей семейства дифиллоботриид, *Spirometra erinacei*. Плероцеркоиды этого лентеца были собраны Артамошиным из ужей Астраханской обл. и доставлены в живом виде в Москву, где из них готовился антиген. Кроме того, этими плероцеркоидами были инвазированы собаки, из которых удалось получить половозрелые формы. Исследованные нами плероцеркоиды и стробилы без сомнения относились к одному виду.

Для сравнения антигенных комплексов взрослых стадий и плероцеркоидов приготавливались водно-солевые вытяжки последовательным экстрагированием водой и 1% раствором поваренной соли. При двухчасовом экстрагировании удавалось получить вытяжки с содержанием белка 2 мг/мл (по методу Лоури). Проявление антигенов производилось кроличьими сыворотками. Животные иммунизировались антигенами половозрелых форм *S. erinacii* с адьювантом Фрейнда.

Сравнивались антигены с помощью реакции преципитации в геле по методу Оухтерлони (Ouchterlony, 1955), в модификации (Абелева,

1960). Результаты учитывались через 10 дней. Полосы преципитации усиливались 0.065% раствором сернокислого кадмия, фотографировались и зарисовывались.

Если антигены имагинальной фазы идентичны антигенам личинок, мы могли ожидать, что сыворотка, полученная от кроликов иммунизированных вытяжками из стробил, при взаимодействии с экстрактами из личинок даст такую же реакцию, как с экстрактами из стробил. Для выяснения этого нами проведено несколько серий экспериментов в различных вариациях. В зависимости от воспроизводимости результатов каждый опыт дублировался от 3 до 6 раз.

Первая серия опытов ставилась по схеме «тройка» (вытяжка стробилы, плероцеркоида, антисыворотка). Чтобы получить представление о всей совокупности антигенов, реакция проводилась с различными концентрациями вытяжек (рис. 1, А, Б, В).

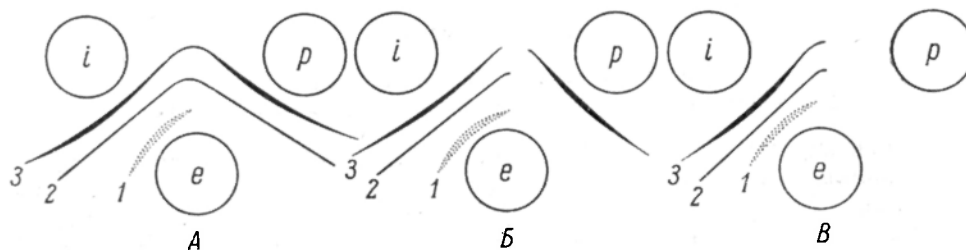


Рис. 1. Сравнение антигенов стробилы и плероцеркоида *Spirometra erinacei* в «тройках».

А — концентрация белка в экстрактах из стробилы и плероцеркоида равны, Б — концентрация белка в экстракте из стробилы 2 мг/мл, в экстракте из плероцеркоида 4 мг/мл, В — концентрация белка в экстракте из стробилы 2 мг/мл, из плероцеркоида 1 мг/мл; 1 — полоса преципитации, выявляющая антиген, специфичный для стробилы, 2, 3 — полосы преципитации, выявляющие антигены, общие для стробилы и плероцеркоидов; i — экстракт из стробилы, p — экстракт из плероцеркоида, e — сыворотка на стробилу.

Такая постановка опытов позволяла наблюдать формирование между лунками с экстрактом из стробилы и гомологичной сывороткой 3, 4 полос преципитации (в отдельных случаях — 5), тогда как антигены плероцеркоида с этой же сывороткой давали не более 2 полос. Образование полос преципитации с антигенами плероцеркоидов и антисывороткой на стробилу указывает на сходство антигенного комплекса личинок половозрелых форм.

Хотя в антигенном комплексе ларвальной и имагинальной фазы можно было найти сходство, однако они имели и различия, которые заключались в количестве антигенов в вытяжках из плероцеркоидов и стробилы преципитирующих с сывороткой на половозрелую форму.

Естественно, что гомологичный антигенный комплекс дает большее число полос преципитации, нежели гетерологичный. Именно этим можно объяснить расхождение наших результатов с результатами исследований Оливер-Гонзалес и де Сале (Oliver-Gonzalez, Rivera de Sale, 1963). Ими применялся иммуноэлектрофоретический анализ для изучения антигенов личинок и взрослых трихинелл. Эти авторы выявили более богатую антигенную структуру у личинок по сравнению с взрослыми формами.

Такой результат можно объяснить применением авторами для проявления фореграмм сыворотки на ларвальную фазу, т. е. гомологичной к личинкам и гетерологичной к стробиле. В наших же исследованиях применялась сыворотка, гомологичная к взрослой фазе.

Перед нами далее возникла необходимость идентифицировать антигены личинок с элементами антигенного комплекса взрослых гельминтов: установить качественное сходство преципитирующих антигенов плероцеркоида и стробилы.

В предыдущих опытах, когда сравниваемые экстракты брались в равных концентрациях (рис. 1, А), можно было заметить, что два антигена дали реакцию идентичности (дугообразные полосы преципитации 2 и 3).

Идентифицировать другие антигены (рис. 1, *I*) при этой схеме эксперимента не удалось, так как возможно, что один из общих антигенов при одинаковом содержании белка в вытяжках мог оказаться в одной из них в настолько малой концентрации, что не мог быть выявлен сывороткой. Общие антигены взрослых и плероцеркоидов можно выявить также по их способности истощать иммунные сыворотки. При этом оказалась удобной схема опыта в «четверках» (по Абелеву, 1960). Мы применили эту схему в трех формах, дублируя каждый опыт несколько раз (рис. 2, *A*).

В первом варианте опыта антигены стробилы и плероцеркоида (с содержанием белка 2 мг/мл) помещались в лунки, расположенные по диаго-

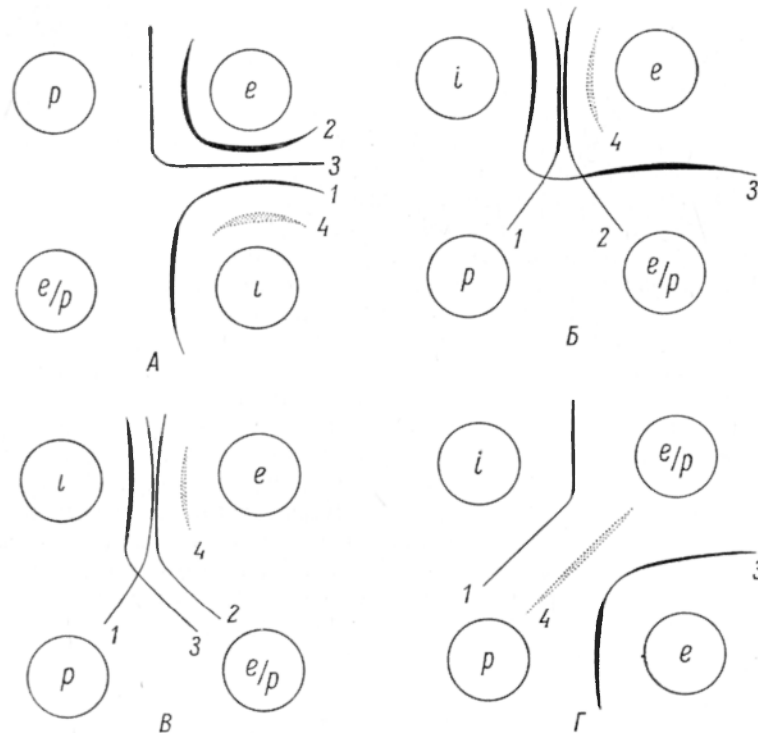


Рис. 2. Идентификация полос преципитации в «четверках».

A — 1-й, *B*, *V* — 2-й, *Г* — 3-й варианты опытов;
e/p — сыворотка на стробилу, истощенная гомогенатом плероцеркоида. (Остальные обозначения те же, что и на рис. 1).

нали квадрата (рис. 2, *A*). По другой диагонали располагались лунки с нативной антисывороткой к стробиле и с той же сывороткой, но предварительно истощенной антигенами плероцеркоида. Образование полос преципитации происходило в области наименьшего расстояния между лунками. На рис. 2, *A* видно, что антигены плероцеркоида (*p*) дали с неисощенной сывороткой две полосы преципитации (полосы 2 и 3), а антигены стробилы (*i*) четыре (полосы 1, 2, 3 и 4). В данном случае подтвердились наши выводы, сделанные на основании опытов в схеме «тройка» (рис. 1). Рис. 2 показывает также, что антисыворотка на имагинальную фазу была истощена антигенами плероцеркоида до такой степени, что не могла работать с ними, но сохраняла способность взаимодействовать с экстрактом из стробилы, давая одну полосу преципитации (полоса 1), в отличие от неисощенной сыворотки, образующей 4 полосы.

Во втором варианте опыта (рис. 2, *B*) по углам одной стороны квадрата находились антигены, а по углам противоположной стороны истощенная и нативная антисыворотка на стробилу, причем последняя находилась на наименьшем расстоянии от гомологического антигена — экстракта из стробилы (рис. 2, *B*). При такой постановке опыта между

нативной сывороткой и экстрактом из стробилы формируются 3—4 полосы преципитации. Две из них (рис. 2, Б, полосы 2 и 3) формируются между нативной антисывороткой и обоими экстрактами. Другими словами, они образуются за счет антигенов, общих для стробилы и личинок. Полоса 3 (рис. 2, Б) продолжается между истощенной в неистощенной сыворотками. В этой области она связана с реакцией нативной сыворотки с избытком истощающего антигена. Подобрав дозу этого антигена, можно избежать его избытка; тогда расположение полос преципитации будет таким, как это показано на рис. 2, В.

Полоса 1 (рис. 2, Б) изгибается таким образом, что участок ее, лежащий в середине схемы, располагается между лунками с вытяжкой из стробилы (*i*) и истощенной сывороткой (*e/p*). Эта полоса указывает на наличие антигена, специфичного для стробилы.

В третьем варианте опыта антигены и сыворотки располагались так, что экстракту из стробилы противолежала истощенная сыворотка, а нативная располагалась по диагонали (рис. 2, Г). При такой постановке опыта между экстрактами из стробилы (*i*) и нативной сывороткой (*e*) формируются три полосы преципитации (полосы 1, 4, 3, рис. 2, Г). Одна из них (полоса 3), образуется за счет реакции сыворотки на стробилу с экстрактом из плероцеркоида (*p*). Ее продолжение в область между сыворотками объясняется избытком истощающего антигена в лунке *e/p*. Полоса 1 (рис. 2, Г) между лунками с экстрактом из стробилы и истощенной сывороткой образуется за счет антигена, специфичного для стробилы. Полоса 4 лежит в центре и возникает в результате взаимодействия антигена из стробилы и гомологичной сыворотки.

Из наших опытов следует, что в экстракте из взрослого гельминта можно обнаружить две различные группы антигенов. Одна из них присутствует в плероцеркоидах, а другая отсутствует в них. Общих антигенов в плероцеркоиде, конечно, больше, чем два, на это указывает то обстоятельство, что антигены плероцеркоида в значительной мере истощают антисыворотку, полученную на стробилу. Так, из 4—5 полос, сформировавшихся при взаимодействии антигенов стробилы с нативной сывороткой, остается только 1 после адсорбции этой сыворотки гомогенатом плероцеркоида.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате сравнения антигенной структуры половозрелых форм *Spirometra erinacei* и плероцеркоидов этого лентеца нам удалось выявить определенное сходство антигенных комплексов обеих возрастных форм. Но среди полного комплекса антигенов стробилы обнаруживаются дополнительные антигены, качественно отличные от личиночных и отсутствующие у последних. Установленная закономерность согласуется с результатами иммуноэлектрофоретического анализа антигенов *Schistosoma mansoni*, проведенного Капрон и др. (Capron et al., 1965). Эти авторы установили, что из 21 фракции взрослых шистозом 14 оказались общими с церкариями и 11 — с антигенами яиц. Последнее позволяет считать, что антигены, отличающие взрослого паразита от его личиночной фазы, можно отнести к группе стадиоспецифических.

Существование такого рода антигенов доказано также на многих организмах из других систематических групп [Аверх и Геранимус, 1937; Педерсен (Pedersen, 1947); Тельфер, Вильямс (Telfer, Williams, 1953); Мейтон (Mayton, 1951); Спар (Spar, 1953), и др.]. Больше того, некоторые из этих антигенов, были выделены в чистом виде и детально изучены Педерсен (Pedersen, 1947), Майерс, Дойч (Meyers, Deutsch, 1955).

Появление в тканях стадиоспецифических антигенов можно объяснить тем, что в процессе онтогенеза каждой фазе соответствуют определенные особенности обменных процессов. Это находит свое отражение в белковом составе и соответственно в антигенной структуре тканей (Вязов, 1962).

Наличие стадиоспецифических антигенов при правильной постановке опытов не исключает возможности видовой идентификации взрослых и личиночных форм паразитов, поскольку на всех фазах развития в антигенном комплексе можно выделить общие компоненты, несущие видовую специфичность (Вязов, 1962).

Существование же разницы в антигенной структуре личинок и взрослых форм усложняет использование иммунологического теста в иммуносистематике, поэтому при диагностике вида паразита наиболее удобно использование организмов на одинаковых фазах развития.

Л и т е р а т у р а

- А б е л е в Г. И. 1960. Модификация метода преципитации в агаре для сравнения двух систем антигенантитела. Бюлл. эксп. биол. и мед., 49(3) : 118.
- А в е р х В. В., Г е р а н и м у с Е. С. 1937. Серологический анализ онтогенеза у пчел. Бюлл. эксп. биол. и мед., 4(6) : 505.
- В я з о в О. Е. 1962. Иммунология эмбриогенеза. Изд. «Медицина», М. : 51.
- К р а в ц о в Э. Г. 1965. О возможности использования реакции преципитации в агаре для целей систематики. Тр. 1-го Московск. мед. инст., 10 : 71—74.
- К р а в ц о в Э. Г. 1966. К вопросу изучения антигенной структуры некоторых дифиллоботриид в свете их систематики. Докл. АН СССР (паразитология), 171(4) : 1005.
- Ч и ж о в а Т. П., Г о ф м а н - К а д о ш н и к о в П. Б., К р а в ц о в Э. Г. 1962. Плероцеркоиды рыб Карелии и вопрос об их эпидемиологическом значении. Мед. паразитол. и паразитарн. бол., 31 (2) : 213—223.
- С а р р о n A., B i q u e t J., R o s e F., V e r n e s A. 1955. Les antigenes de *Schistosoma mansoni*. Ann. Inst. Pasteur, 109(5) : 798—810.
- M e l c h e r L. R. 1943. An antigenic analysis of *Trichinella spiralis*. Journ. Infect. Dis., 73(1) : 31—39.
- M a y t o n R. M. 1951. Antigens in developing new embryo. Nature, 168(4264) : 120—121.
- M e y e r s W. M., D e u t s c h H. F. 1955. Immunological studies of fetuin. Arch. Biochem. Biophys., 54(1) : 38—44.
- O l i v e r - G o n z a l e z J. 1940. The in vitro action of immune serum on the larvae and adults of *Trichinella spiralis*. Journ. Infect. Dis., 67(3) : 292—301.
- O l i v e r - G o n z a l e z J., R i v e r a d e S a l e. 1963. Immuno-electrophoretic analysis of adults and larvae of *Trichinella spiralis*. Americ. Journ. of Trop. med. a. Hyg., 12(4) : 539—540.
- O l i v e r - G o n z a l e z J. 1963. Seminar on immunity to parasitic helminths. III. Serological studies on stage specificity in *Trichinella spiralis*. Exp. Parasitol., 13(1) : 13—15.
- O u c h t e r l o n y O. 1955. Antigen-antibody reaction in gele. Acta pathol. et microb. Scand., 89(5) : 531—555.
- P e d e r s e n R. O. 1947. Ultracentrifugal and electrophoretic studies on fetuin. Journ. physiol. coll. Chem., 51(1) : 164.
- S p a r G. L. 1953. Antigenic differences among early developmental stages of *Rana pipiens*. Journ. exp. Zool., 123(3) : 467—497.
- T e l f e r W. H., W i l l i a m s C. M. 1953. Immunological studies of insect metamorphosis. I. Qualitative and quantitative description of the blood antigens of *Cecropia silkworm*. Journ. Gen. Physiol., 36(3) : 389—413.
- W i l h e l m i R. W. 1940. The precipitin reaction applied to certain problems in parasitology. Journ. parasitol., 26(6), suppl. : 43.

THE COMPARISON OF THE ANTIGENIC STRUCTURE OF THE IMAGINAL PHASE AND PLEUROCERCIDS OF SPIROMETRA ERINACEI

E. G. Kravtsov

S U M M A R Y

The similarity in the antigenic structure of pleurocercoids and adult forms of *Spirometra erinacei* have been revealed with the *vid* of precipitation reaction in gel.

Water-salt extracts of strobiles, apart from the common components, contained additional ones differing from antigenes of pleurocercoids.

Such phase specific antigenes complicate employing the immunological test in taxonomy; therefore when identifying the species, it is better to use helminths of the same phase of development. The presence of specific antigenes found during the whole ontogenesis, does not exclude, however, the use of immunological methods for exact definition of parasites.