

СЕКРЕТОРНЫЕ БЕЛКИ ПЛЕРОЦЕРКОИДОВ ЦЕСТОДЫ *DIGRAMMA INTERRUPTA* И ИХ ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ

Ю. М. Крылов, А. Л. Маленев, Е. Е. Соколов, Г. П. Краснощеков

Изучены фракционный состав и ферментативная активность секреторных белков плероцеркоидов *Digrama interrupta*. Показано, что плероцеркоиды секретируют 26 белков, имеющих молекулярную массу от 3.9 до 112.2 кДа. Секреторные белки обладают протеазной, ДНКазной и РНКазной активностью.

При изучении организации и особенностей функционирования системы паразит—хозяин особое место занимает вопрос о том, какие вещества выделяет паразит в организм хозяина и какова их функциональная значимость. В настоящий момент установлено, что в секреторном материале цестод содержатся антигенные детерминанты (Joshua e. a., 1988). Можно предположить, что в секреторном материале, помимо антигенных детерминант, должны содержаться вещества, с помощью которых паразит регулирует свои взаимоотношения с хозяином, модифицируют его реакции. Цель настоящего краткого сообщения — дать первоначальное описание секреторных белков плероцеркоидов цестоды *Digrama interrupta*, паразитирующей в брюшной полости леща.

Материалы и методы. Секрецию белков у плероцеркоидов изучали в экспериментальных условиях *in vitro*. Источником паразитов служил лещ, выловленный в летний период в Куйбышевском водохранилище. После вскрытия брюшной полости плероцеркоидов отмывали от примесей белков хозяина в растворе Рингера—Локка. Инкубацию осуществляли в пластиковых чашках Петри в средах двух типов: F-12 (SIGMA, США) и растворе Рингера—Локка для хладнокровных в течение 30 мин при комнатной температуре. После окончания времени инкубации паразита извлекали из среды и выделяли белки с помощью осаждения ТХУ. С целью выявления взаимосвязи белков с паразитом плероцеркоиды инкубировали в среде, содержащей неионный детергент Нонидет Р-40 в концентрации 0.1 и 0.5 % в течение 15 мин. Количество белка определяли с помощью Кумасси G-250. Фракционирование белков осуществляли с помощью электрофореза в градиентных 10—20%-ных пластинах ПААГ в системе ДСН-2—МЕ. Гели окрашивали Кумасси R-250 (SERVA, ФРГ). Молекулярную массу белков определяли с помощью маркеров РМ 4 и РМ 5 фирмы SERVA (ФРГ). Для исключения присутствия в культуральной среде мембранных компонентов культуральную среду центрифугировали 120 мин при 105 000 g и анализировали супернатант и смыв со дна пробирки с помощью спектрофотометрии от 240 до 340 нм на спектрофотометре «Спекорд М 40».

Секреторные белки плероцеркоидов *Digamma interrupta* Мол, масса
 10—20 %-ная градиентная пластина ПААГ с ДСН и 2-МЕ. кДа
 Secretory proteins of plerocercoids of *Digamma interrupta*.

Помимо этого, в культуральной среде проводили определение активности протеаз, дезоксирибонуклеаз и рибонуклеаз. Активность протеаз определяли с помощью хромогенного субстрата ОКА—АС (НПО «Фермент», Вильнюс), ДНКаз и РНКаз по гидролизу ДНК и РНК соответственно. Активность ферментов определяли в градиенте рН от 4 до 10. В статье приводится материал, полученный на 12 плероцеркоидах.

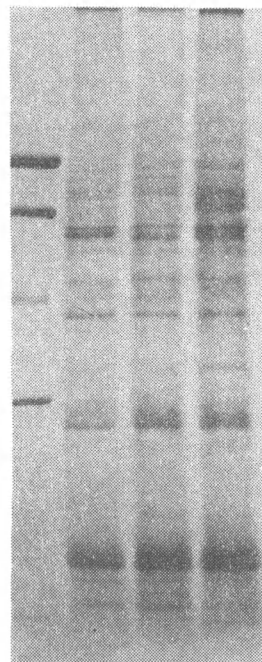
Результаты и обсуждение. Проведенные эксперименты показали, что в условиях *in vitro* плероцеркоиды секретируют белки как в среде, не содержащей питательных веществ, так и в богатой. Различий в спектре не обнаружено. При анализе спектра белков в культуральной жидкости были обнаружены 26 дискретных фракций с молекулярными массами от 3.9 до 112.2 кДа (см. рисунок). Анализ образцов культуральной среды после ультрацентрифугирования позволяет утверждать, что все обнаруженные белки являются секреторными, мембранные компоненты в среде отсутствуют. Секреторные белки плероцеркоидов можно разделить на три группы: низкомолекулярные — с молекулярной массой от 3.9 до 27.5 кДа в количестве 10. Со средним значением молекулярной массы от 33.5 до 63.8 кДа 8 белков и 8 высокомолекулярных со значением молекулярной массы от 70.8 до 112.2 кДа. Анализ электрофореграмм белков плероцеркоидов после инкубации в среде, содержащей «Нонидет Р 40», позволяет утверждать, что все обнаруженные белки принадлежат паразиту и, очевидно, связаны с поверхностной мембраной и эпителиальными клетками.

При анализе ферментативной активности секреторных белков были обнаружены протеазная, РНКазная и ДНКазная активности ($n=3$). Обнаруженная зависимость изменения ферментативной активности от рН среды позволяет предположить, что паразит секретирует как кислую, так и щелочную протеазы и РНКазы, в то время как ДНКазы имеет только один рН оптимум и, очевидно, представлена в секрете только щелочной формой. Вопрос о том, каково назначение этих ферментов, в настоящее время однозначно решен быть не может. Можно утверждать, что эти ферменты принимают участие в катаболизме макромолекул хозяина перед поглощением их компонентов паразитом. Протеазы могут принимать участие в защите паразита от иммунного ответа хозяина, модифицировать локальные реакции.

При анализе ферментативной активности секреторных белков были обнаружены протеазная, РНКазная и ДНКазная активности ($n=3$). Обнаруженная зависимость изменения ферментативной активности от рН среды позволяет предположить, что паразит секретирует как кислую, так и щелочную протеазы и РНКазы, в то время как ДНКазы имеет только один рН оптимум и, очевидно, представлена в секрете только щелочной формой. Вопрос о том, каково назначение этих ферментов, в настоящее время однозначно решен быть не может. Можно утверждать, что эти ферменты принимают участие в катаболизме макромолекул хозяина перед поглощением их компонентов паразитом. Протеазы могут принимать участие в защите паразита от иммунного ответа хозяина, модифицировать локальные реакции.

Вопрос о том, какие из 26 выявленных белков обладают ферментативной активностью и каково их функциональное назначение во взаимоотношениях паразита и хозяина является предметом наших дальнейших исследований.

112,2
 104,7
 102,3
 96,6
 89,1
 75,9
 73,3
 70,8
 63,8
 60,9
 58,2
 50,7
 47,9
 45,7
 42,7
 33,5
 27,5
 26,9
 17,8
 13,0
 12,7
 9,4
 8,4
 7,2
 5,9
 3,9



Список литературы

Joshua G. W. P., Harrison L. J. S., Sewell M. M. H. Excreted / secreted products of developing *Taenia saginata* metacestodes // *Parasitology*. 1988. Vol. 97. P. 477—487.

Институт экологии Волжского бассейна
 АН СССР, Тольятти

Поступила 12.04.1990

SECRETORY PROTEINS OF PLEROCERCOIDS OF THE CESTODE DIGRAMMA INTERRUPTA
AND THEIR ENZYME ACTIVITY

Yu. M. Krylov, A. L. Malenev, E. E. Sokolov, G. P. Krasnoshchekov,

Key words: secretory proteins, activity, protease, DNAase, RNAase

S U M M A R Y

A composition of secretory proteins of plerocercoids of the cestode *Digamma interrupta* and their enzyme activity have been studied. It has been shown that plerocercoids produce 26 secretory proteins with molecular weight range of 3.9 to 112.2 kDa. These secretory polypeptides possess protease, DNAase and RNAase activities.
