

ИЗМЕНЕНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА ПЕЧЕНИ НАЛИМА *LOTA LOTI* (L.) ПРИ ИНВАЗИИ ПЛЕРОЦЕРКОИДАМИ *TRIAENOPHORUS NODULOSUS*

О. Б. Васильева, В. В. Лаврова, Е. П. Иешко, Н. Н. Немова

Учреждение Российской академии наук

Институт биологии Карельского научного центра РАН, г. Петрозаводск, Россия,

e-mail: vasil@krc.karelia.ru

Введение

Для системы «паразит – хозяин» свойственен антагонизм (Давыдов, 1991; Thomas, 2002; Barrett, 2009). Паразит использует хозяина в качестве среды обитания и источника питания, адаптируясь соответствующим образом к его биохимическим особенностям, поскольку, как известно, гельминты не способны самостоятельно синтезировать многие вещества (Высоцкая, Сидоров, 1989). В тоже время инвазия вызывает биохимические перестройки зараженных тканей, направленные на избирательное поглощение питательных веществ, и может привести к серьезным структурным и функциональным изменениям в органах. В связи с этим развивается ответная реакция хозяина, направленная на поддержание функционирования зараженных органов, т.е. компенсацию паразитарного воздействия (Давыдов, Микряков, 1998).

Среди цестод, которые вызывают массовые инвазии и гибель ценных промысловых рыб, значительное место занимает *Triaenophorus nodulosus* из отряда *Pseudophyllidea*. Целью данной работы являлся сравнительный анализ основных липидных компонентов гельминтов *Triaenophorus nodulosus*, окружающих их капсул и инвазированной печени налима *Lota lota* (L.).

Материалы и методы

Объектами исследования данной работы являлись налим *Lota lota* (L.) и инкапсулированные гельминты *Triaenophorus nodulosus* на стадии плероцеркоида. Отлов рыбы проводился из Онежского озера в летний период (август), поскольку экстенсивность и интенсивность заражения плероцеркоидами *T. nodulosus* нарастает с июня по август (Билич, Крыжановский, 2002;

Letherman, 2007). В данный период налим активно питается планктонными рачками, зараженными плероцеркоидами возбудителя.

Для липидного анализа взяты пробы печени, плероцеркоидов и их капсул. Среди зараженных рыб отбирали варианты с разной степенью инвазии. Критерием оценки низкой степени заражения служили образцы печени с 1–6 плероцеркоидами, для высокой степени инвазии – печень налима, содержащая более 20 плероцеркоидов. Контролем являлась свободная от инвазии печень. Чтобы уменьшить возможное влияние на липидный состав других факторов, кроме заражения, для сравнения отбирали контрольную и зараженную рыбу с одинаковыми морфологическими, физиологическими и экологическими параметрами (размер, вес, пол, место и время отлова).

Липидный статус оценивали по следующим показателям: общие липиды: триацилглицерины, фосфолипиды, холестерин и его эфиры; общие фосфолипиды: фосфатидилинозитол, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин, сфингомиелин. Фиксацию проб осуществляли смесью Фолча (хлороформ/ метанол в соотношении 2/1, по объему) (Folch et al., 1957). Общие липиды разделяли методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей: петролейный эфир/ диэтиловый эфир/ уксусная кислота (в соотношении 90/10/1, по объему). Идентификацию отдельных пятен проводили общепринятыми спектрофотометрическими методами (Сидоров и др., 1972; Engelbrecht et al., 1974). Анализ отдельных фракций фосфолипидов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (Arduini et al., 1996). Фракционирование осуществлялось на стальной колонке, элюент состоял из смеси растворителей: ацетонитрил/ гексан/ метанол/ фосфорная кислота в соотношении

918/30/30/17,5, по объему. Для обработки данных применялись общепринятые методы вариационной статистики (Ивантер, Коросов, 2003).

Результаты и обсуждение

В результате сравнительного анализа гельминтов *Triacnophorus nodulosus*, капсул и инвазированной печени налима *Lota lota* (L.) установлена качественная идентичность их липидного состава. Во всех образцах содержатся основные фракции общих липидов – запасные (триацилглицерины и эфиры холестерина) и структурные (фосфолипиды и холестерин). Однако отмечены различия в количественном содержании отдельных липидных компонентов.

Установлено высокое содержание триацилглицеринов в инвазированной печени в отличие от гельминтов, для которых характерна высокая концентрация структурных липидов. Преобладание структурных компонентов над содержанием запасных липидов у плероцеркоидов, по-видимому, связано с особенностями их жизнедеятельности. *T. nodulosus*, паразитирующие в печени налима, находятся в условиях низкого парциального давления кислорода, поэтому необходимую энергию

они получают, главным образом, за счет анаэробного расщепления углеводов. Триацилглицерины в качестве источника энергии в этих условиях, видимо, используются ограниченно (Сидоров, 1983; Комов, Шведова, 2004). Характерной особенностью *T. nodulosus*, как и всех цестод, является отсутствие пищеварительной системы, поэтому поглощение гельминтами необходимых веществ осуществляется через всю поверхность тела (Билич, Крыжановский, 2002; Brinker, Hamers, 2007). В связи с этим, особое значение для функционирования покровного эпителия паразита имеет степень вязкости клеточных мембран, которая определяется соотношением основных структурных компонентов биомембран – фосфолипидов и холестерина (ХС/ФЛ), а среди суммарных фосфолипидов – соотношением фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (ФХ/ФЭА). В ходе данного исследования у гельминтов, по сравнению с инвазированной печенью, установлено более низкое значение соотношения ФХ/ФЭА и более высокое значение ХС/ФЛ, что может свидетельствовать о повышении жидкостности мембран у *T. nodulosus* и, возможно, указывает о специфической адаптации внешних покровов гельминта для поглощения веществ (таблица).

Липидный состав капсул и гельминтов *Triacnophorus nodulosus* и печени налима *Lota lota* (L.)

	Печень			Капсула	Гель-минт
	без инвазии (контроль)	низкая степень инвазии	высокая степень инвазии		
Общие липиды, % сухой массы					
Общие липиды	74,83	72,79	46,32 ^a	27,07 ^{c,d}	15,88 ^b
Фосфолипиды	24,29	22,01	20,10 ^a	13,62 ^{c,d}	7,13 ^b
Триацилглицерины	39,01	39,60	19,24 ^a	7,40 ^c	3,16 ^b
Холестерин	10,51	9,26	5,62	5,35	5,28
Эфиры холестерина	2,02	1,92	1,36	0,70	0,31 ^b
Холестерин / фосфолипиды	0,43	0,42	0,28 ^a	0,39	0,74 ^b
Индивидуальные фосфолипиды, % сухой массы					
Фосфатидилинозитол	0,68	0,87	1,60 ^a	1,41 ^d	1,70
Фосфатидилсерин	0,75	0,83	1,21 ^a	1,13 ^d	0,98 ^b
Фосфатидилэтаноламин	5,72	6,08	5,40	3,89	1,99 ^b
Фосфатидилхолин	16,48	13,65 [*]	9,85 ^a	5,86 ^{c,d}	1,52 ^b
Лизофосфатидилхолин	0,19	0,18	1,04 ^a	0,74 ^{c,d}	0,10 ^b
Сфингомиелин	0,37	0,39	0,82 ^a	0,54 ^c	0,74
Фосфатидилхолин / фосфатидилэтаноламин	2,88	2,23	1,82 ^a	1,51 ^{c,d}	0,76 ^b
Жирные кислоты, % суммы ЖК					
18:2(n-6) линолевая кислота	2,70	1,51 [*]	2,48	1,47 ^{c,d}	1,25 ^b
16:0 пальмитиновая кислота	14,89	12,47 [*]	19,42 ^a	17,51	16,03 ^b
Ненасыщенные ЖК	73,57	73,52	66,35 ^a	62,60 ^c	62,34 ^b
Насыщенные ЖК	26,43	29,14	33,65 ^a	37,41 ^c	37,66 ^b
Сумма n-3	11,98	11,90	8,79	13,73 ^{c,d}	16,76 ^b
Сумма n-6	7,14	6,48	7,01	9,21 ^c	7,76 ^b
Насыщенные / ненасыщенные ЖК	0,36	0,39	0,51 ^a	0,59 ^c	0,60

* Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении печени с низкой степенью инвазии и контроля.

^a Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении печени с высокой степенью инвазии и контроля.

^b Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении *T. nodulosus* и печени с высокой степенью инвазии.

^c Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении капсул и печени с высокой степенью инвазии.

^d Различия достоверны при $p \leq 0,05$ при сравнении капсул и *T. nodulosus*.

T. nodulosus, в отличие от кишечных гельминтов, для более эффективного извлечения необходимых соединений из печени должны разрушить окружающие клетки или изменить их проницаемость. В данном случае, плероцеркоиды действуют экзоферментами (протеазы, липазы, фосфолипазы, гиалуронидазы и др.) и/или сильными детергентами, лизирующими мембрану окружающих паразита клеток хозяина (Гурьянова, 1981; Давыдов, Микряков, 1998). Одним из таких детергентов является лизофосфатидилхолин, который в физиологических концентрациях играет роль медиатора, а при увеличении содержания данный фосфолипид нарушает структурную целостность клеточных мембран и, как следствие, может привести к лизису клеток (Сидоров, 1983; Комов, Шведова, 2004; Gallo et al., 1984; Colles, Chisolm, 2000). В данном исследовании установлен более высокий уровень лизофосфатидилхолина в инвазированной печени по сравнению с контролем, что свидетельствует об увеличении проницаемости мембран клеток печени, и, возможно, обеспечивает облегченное поглощение гельминтами из нее необходимых для своей жизнедеятельности соединений (таблица).

Антагонизм между гельминтами и хозяином характеризуется воздействием паразита на зараженный орган и активацией компенсаторных механизмов организма хозяина, в том числе на биохимическом уровне. При инвазии в печени налима происходят изменения в содержании структурных липидных компонентов, которые, как известно, влияют на фазовое состояние биологических мембран (Крепс, 1981; Mazumdar et al., 2005). Нарушение жидкостности биомембран может привести к подавлению функций зараженного органа и развитию патологических процессов, поэтому в организме хозяина развивается ответная реакция в виде модификации липидного состава, направленной на возвращение физического состояния мембран к тому, которое было до паразитарного воздействия. Для поддержания нормального функционирования в инвазированной печени налима происходят изменения содержания мажорных (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина) и минорных (фосфатидилсерина, сфингомиелина) фосфолипидов, степени ненасыщенности жирных кислот, что отражается на значениях такого показателя, как соотношение насыщенных жирных кислот к ненасыщенным (НЖК/ПНЖК), и изменяется соотношение (n-6) и (n-3) жирных кислот в сторону увеличения насыщенности и, как следствие, повышению жесткостности биомем-

бран, направленные на поддержание структурной целостности и нормализацию вязкостности мембран клеток печени (таблица). Таким образом, ферментные системы гельминтов вызывают разжижение мембран клеток зараженного органа для получения веществ, в то время как в печени активируется компенсаторная реакция, направленная на обеспечение более плотной упаковки бислоя, препятствуя увеличению его жидкостности.

Капсулы имеют особое значение для поддержания нормальной жизнедеятельности гельминтов, поскольку они защищают паразитов от специфических антител хозяина и участвуют в поглощении веществ из зараженного органа (Березанцев, 1973; Давыдов, Микряков, 1998; Swiderskia, Xylander, 2000). Согласно литературным источникам, вопрос о механизме формирования капсул является дискуссионным. Существует мнение, что капсулы образуются в результате иммунологических реакций хозяина, т.к. тканевые паразиты, которым является *T. nodulosus* являются высокоантигенными и при попадании в организм хозяина активизируют его специфические и неспецифические иммунные реакции. Таким образом, капсулы – результат защитных реакций хозяина в ответ на действия гельминта (Давыдов, Микряков, 1998). Согласно другим литературным источникам, капсулы синтезируются самим паразитом для защиты от специфических антител и ферментных систем хозяина (Высоцкая, Сидоров, 1989). По результатам гистологических исследований Прониной (1988) клеточные слои капсул состоят из структур двойственного происхождения: наружных, более сходных по своему составу к тканям хозяина, и внутренних, более сходных с составом гельминтов. В результате данного исследования установлено качественное соответствие липидного состава капсул, гельминтов и печени. По количественному содержанию липидных и фосфолипидных компонентов капсулы занимают промежуточное положение между паразитами и зараженным органом, а по жирнокислотному составу капсулы более сходны с плероцеркоидами, чем с тканью печени (таблица).

Для оценки влияния паразитарной инвазии плероцеркоидов *Triaenophorus nodulosus* на липидный состав печени налима *Lota lota* (L.) проведен сравнительный анализ липидного состава печени налима с разной степенью заражения и свободной от инвазии печени (контроль). Установлено соответствие концентраций липидных

компонентов в печени с низкой степенью инвазии и контролем, что, вероятно, обусловлено недостаточным уровнем заражения для изменения липидных концентраций. Исключения составляют фосфатидилхолин, пальмитиновая (16:0) и линоленовая (18:3(n-3)) кислоты (таблица), поскольку изменение концентрации данных компонентов в печени налима при низкой степени инвазии, вероятно, является первичным ответом на паразитирование плероцеркоидов. Как известно, некоторые липидные компоненты используются в качестве маркеров для определения физиологического состояния организма (Сидоров, 1983; Немова, Высоцкая, 2004; Askman, 1997). В связи с этим, фосфатидилхолин и данные жирные кислоты могут применяться для оценки степени влияния инвазии на печень рыб.

Показано, что при высокой степени инвазии уровень триацилглицеринов в печени снижается практически в 2 раза (таблица). Печень активно участвует в обменных процессах, являясь основным органом метаболизма липидов. Кроме того, у налима печень является еще и основным органом депонирования запасных липидов – триацилглицеринов (Мельянцев, 1986; Лизенко, Болгова, 1987; Cowey, 1987). Многие процессы, такие как генеративные (созревание гонад, нерест и др.) и сезонные (нагул, зимовка и др.), находятся в непосредственной зависимости от уровня запасных липидов, которые необходимы рыбам для обеспечения нормальной жизнедеятельности. Снижение концентрации триацилглицеринов может привести к нарушению жизнеспособности налима, вплоть до его гибели.

В липидном составе печени с высокой степенью заражения установлены количественные изменения не только в содержании запасных ли-

пидов, но и в концентрации структурных компонентов. Печень примерно на 80% состоит из мембран и ее работа определяется, прежде всего, их нормальным функционированием, поэтому изменения в содержании структурных липидов в зараженном органе может свидетельствовать о нарушении метаболизма в гепатоцитах и, как следствие, возможном развитии деструктивных процессов. Известно, что жировая дистрофия печени сопровождается изменениями в фосфолипидном составе мембран клеток, а именно снижается уровень фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина, возрастает содержание сфингомиелина и лизофосфатидилхолина (Schlemmer et al., 2005; Marí, Fernández-Checa, 2007; Tessari et al., 2009). В проведенном исследовании установлена данная тенденция, и, таким образом, изменение указанных биохимических показателей могут свидетельствовать о развитии патологических процессов на гистологическом уровне.

Таким образом, проведенный анализ липидного состава паразитов и зараженного органа характеризует взаимоотношения гельминтов *Triaenophorus nodulosus* и налима *Lota lota* (L.) как антагонистические. Плероцеркоиды для своего развития используют необходимые соединения из печени налима, нарушая при этом ее работу, что активизирует компенсаторную реакцию зараженного органа для нормализации функциональной активности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 08-04-01140-а, программы Президента РФ «Ведущие научные школы России» НШ № 3731.2010.4 и Программы ОБН РАН «Биологические ресурсы России» на 2009–2011 гг.

Литература

Березанцев Ю. А. Формирование капсул вокруг личинок паразитических червей / Ю. А. Березанцев // Вопросы патологической анатомии. – 1973. – № 83. – С. 33–43.

Билич Г. Л. Биология. Полный курс: в 3 т. / Г. Л. Билич, В. А. Крыжановский. – М.: ООО Издательский дом «ОНИКС 21 век», 2002. – Т. 3. – 544 с.

Высоцкая Р. У. Сравнительная биохимия гельминтов рыб / Р. У. Высоцкая, В. С. Сидоров – Л.: «Наука», 1989. – 151 с.

Гурьянова С. Д. Липидный состав личиночной и взрослой форм некоторых цестод / С. Д. Гурьянова, В. И. Фрезе // Сравнительные аспекты биохимии рыб и некоторых других животных. – 1981. – С. 116–121.

Давыдов О. Н. Паразито-хозяйные отношения при цестодозах рыб / О. Н. Давыдов. – М.: Наука, 1991. – 240 с.

Давыдов В. Г. Иммунологические и биохимические аспекты взаимоотношений гельминта и хозяина / В. Г. Давыдов, В. Р. Микряков. – Наука, 1998. – 152 с.

Ивантер Э. В., Коросов А. В. Введение в количественную биологию. Петрозаводск: ПетрГУ, 2003. – 304 с.

Комов В. П. Биохимия: Учеб. для вузов. / В. П. Комов, В. Н. Шведова. – М.: Дрофа, 2004. – 640 с.

Крепс Е. М. Липиды клеточных мембран / Е. М. Крепс. – Л.: Наука, 1981. – 339с.

- Лизенко Е. И. Экологическая биохимия липидов рыб / Е. И. Лизенко, О. М. Болгова. – Петрозаводск, 1987. – 324 с.
- Мельянец В. Г. Налим, его образ жизни и промысел / В. Г. Мельянец. – Петрозаводск, 1986. – 52 с.
- Немова Н. Н. Биохимическая индикация состояния рыб / Н. Н. Немова, Р. У. Высоцкая. – М.: Наука, 2004. – 215 с.
- Пронина С. В. Изменение аргирофильной стромы печени некоторых рыб при инвазии плероцеркоидами *Triaenophorus nodulosus* и *Diphyllbothrium dendriticum* / С. В. Пронина // Паразитология. – 1988. – № 11. – С. 361–364.
- Сидоров В. С. Экологическая биохимия рыб – липиды / В. С. Сидоров. – Л.: Наука, 1983. – 240 с.
- Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М., Нефедова З. А. 1972. Липиды рыб. 1. Методы анализа. Тканевая специфичность ряпушки *Coregonus albula* L. / Сидоров В. С., Лизенко Е. И., Болгова О. М., Нефедова З. А. // Лососёвые (Salmonidae) Карелии. Петрозаводск: Карел. фил. АН СССР. Вып. 1. С. 152–163.
- Ackman R.G. Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some freshwater fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids / R. G. Ackman // Comp.Biochem.Physiol. – 1997. – № 22. – P. 107–129.
- Arduini A. High performance liquid chromatography of long-chain acylcarnitine and phospholipids in fatty acid turnover studies / A. Arduini, A. Pescechiera, S. Dottori // J. Lipid Res. – 1996. – V. 37. – № 2. – P. 684–689.
- Barrett J. Forty years of helminth biochemistry / J. Barrett // – Parasitology. – 2009. – V. 136. – № 12. – P. 1633–42.
- Brinker A. Evidence for negative impact of plerocercoid infection of *Triaenophorus nodulosus* on *Perca fluviatilis* L. stock in Upper Lake Constance / A. Brinker, R. Hamers // Journal of Fish Biology. – 2007. – V. 71. – № 1. – P. 129–147.
- Colles S.M. Lysophosphatidylcholine-induced cellular injury in cultured fibroblasts involves oxidative events / S.M. Colles, G.M. Chisolm // Journal of Lipid Research. – 2000. – V. 41. – P. 1188–1198.
- Cowey C.B. Lipid nutrition in fish / C.B. Cowey, J.R. Sargent // Comp.Biochem.Physiol. – 1987. – № 57. – P. 269–273.
- Engelbrecht F.M. Cholesterol determination in serum. A rapid direction method / F.M. Engelbrecht, F. Mari, J.T. Anderson // S.A. Med. J. – 1974. – V. 48. – № 7. – P. 250–356.
- Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue (for brain, liver and muscle) / J. Folch, M. Lees, G.H. Sloan-Syanley // J. Biol. Chem. – 1957. – V. 226. – P. 497–509.
- Gallo R.L. Lysophosphatidylcholine cell depolarization: Increased membrane permeability for use in the determination of cell membrane potentials / R.L. Gallo, R.P. Wersto, R.H. Notter, J.N. Finkelstein // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1984. – V. 235. – № 2. – P. 544–554.
- Letherman T.B. Evidence for negative impact of plerocercoid infection of *Triaenophorus nodulosus* on *Perca fluviatilis* L. / T. B. Letherman // The Journal of Fish Biology. – 2007. – № 14. – P. 129–147.
- Mari M. Sphingolipid signalling and liver diseases / M. Mari, J.C. Fernández-Checa // Liver International. – 2007. – V. 27. – № 4. – P. 440–450.
- Mazumdar T. Influence of phospholipid composition on the adjuvanticity and protective efficacy of liposome-encapsulated *Leishmania donovani* antigens / T. Mazumdar, K. Anam, N. Ali // Journal of Parasitology. – 2005. – V. 91. – № 2. – P. 269–274.
- Schlemmer H.-P.W. Hepatic phospholipids in alcoholic liver disease assessed by proton-decoupled ³¹P magnetic resonance spectroscopy / H.-P.W. Schlemmer, T. Sawatzki, S. Sammet, I. Dornacher, P. Bachert, G. Kaick, R. Waldherr, H.K. Seitz // Journal of Hepatology. – 2005. – V. 42. – № 5. – P. 752–759.
- Swiderskia Z. Vitellocytes and vitellogenesis in cestodes in relation to embryonic development, egg production and life cycle / Z. Swiderskia, W.E.R. Xylander // International Journal for Parasitology. – 2000. – V. 30. – № 7. – P. 805–817.
- Tessari P. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease / P. Tessari, A. Coracina, A. Cosma, A. Tiengo // Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. – 2009. – V. 19. – № 4. – P. 291–302.
- Thomas J.D. The ecology of fish parasites with particular reference to helminth parasites and their salmonid fish hosts in Welsh rivers: a review of some of the central questions / J.D. Thomas // – Adv. Parasitol. – 2002. – V. 52. – № 1. – P. 1–154.

CHANGE OF LIPID COMPOSITION OF LIVERS BURBOT *LOTA LOTA* (L.) AT INVASION OF PLEROCERCOID *TRIAENOPHORUS NODULOSUS*

O.B. Vasiljeva, V.V. Lavrova, E.P. Ieshko, N.N. Nemova

*Institute of Biology, Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russia,
e-mail: vasil@krc.karelia.ru*

Comparative analysis of burbot liver lipid composition with plerocercoid and capsule lipid composition denote qualitative identity and quantitative differences of its. The degree of burbot lipid composition change depends on parasite invasion level.