

ОСОБЛИВОСТІ ОБМІНУ РЕЧОВИН У ТКАНИНАХ ІМАГІНАЛЬНОЇ СТАДІЇ СТЬОЖАКІВ — *BOTHRIOCEPHALUS ACHEILOGNATHI*

І. Д. Юськів

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького

У статті наведені дані про метаболізм ліпідів, білків, інтенсивність синтезу білку при використанні глюкози, лізину, пальмітинової кислоти, мічених радіоактивним вуглицем та енергетичні процеси у гомогенатах статевозрілих стьожкових червів Bothriocephalus acheilognathi.

Ключові слова: ЦЕСТОДА, BOTHRIOCEPHALUS ACHEILOGNATHI, ЛІПІДИ, КЛАСИ ЛІПІДІВ, ЖИРНІ КИСЛОТИ, БІЛОК, АМІНОКИСЛОТИ, ТРАНСАМІНАЗИ, СИНТЕЗ

Тегумент — зовнішній покрив цестоди виконує роль травлення і всмоктування речовин. На поверхні ворсинок і мікрворсинок тегумента адсорбуються мукополісахариди, окисно-відновні ферменти, пептидази, протеїнази — травні ферменти хазяїна. Надлишок енергетичних ресурсів цестоди відкладають у зірчастих клітинах паренхіматозного шару [1]. Крім цього, цестоди не тільки адсорбують ферменти із кишечника риби, але й здатні синтезувати і власні ферменти, за рахунок чого підсилюється ферментативний гідроліз субстратів, що забезпечують додаткові джерела живлення гельмінта [1, 2, 3].

У зв'язку з цим, метою роботи було дослідження особливостей обміну ліпідів і білків, які асимілює тканина гельмінта *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934 (*Pseudophyllidea* Carus, 1863) в імагінальній стадії.

Матеріали і методи

Об'єктом вивчення служили статевозрілі стьожкові черви виду *Bothriocephalus acheilognathi* ряду *Pseudophyllidea*. Відбір матеріалу проводили літом у серпні місяці. Цестоди — *Bothriocephalus acheilognathi* відбирали із кишечника свіжовиловлених цьоголіток коропа. Кожна проба являла собою середній матеріал, куди входила наважка тканин від 10–15 особин ботріоцефалосів. Гельмінтів відмивали у воді від частин хімуса та заморожували в рідкому азоті і доставляли в лабораторію у посудині Дьюара для подальшої обробки.

Екстракцію ліпідів здійснювали сумішню хлороформ-метанолу (2:1, %) за методом Фолча [4]. Загальний вміст ліпідів визначали гравіметричним методом, а окремі класи — за допомогою тонкошарової хроматографії на силікагелі в системі розчинників гексан-диетиловий ефір-льодова оцтова кислота у відношенні 70:30:1 [5]. Плями ліпідів на хроматограмі проявляли випарами йоду, а кількість визначали на спектрофотометрі. Жирнокислотний склад ліпідів визначали методом газоріднинної хроматографії [6]. Вміст загального білка у тканині визначали за методом Лоурі в модифікації Р. П. Марцишаускаса і інших [7]. Активності аспартат- (АсАТ-К.Ф.2.6.1.1) і аланін- (АлАТ-К.Ф.2.6.1.2) амінотрансфераз визначали стандартним набором реактивів за методом Райтмана-Френкеля, а концентрацію сечової кислоти — фосфорно-вольфрамовим методом за Генрі і інших [8]. Амінокислотний склад білків у тканині цестод визначали на автоматичному аналізаторі

амінокислот — ААА Т339 [9]. Інтенсивність синтезу білків і енергетичних процесів визначали за методом Вовка-Яновича [10]. 200 мг тканини цестод перенесли в інкубаційні посудинки з фосфатним буфером Кребс-Рінгера (відношення маси тканини до об'єму буфера — 1:10, рН — 7,4), до якого додавали 1 мкКюрі [$2\text{-}^{14}\text{C}$] лізину, [$6\text{-}^{14}\text{C}$] глюкози і [$1\text{-}^{14}\text{C}$] пальмітинової кислоти та інкубували протягом 60 хвилин в ультратермостаті при температурі 25 °С при постійному перемішуванні [11]. У деліпідованому залишку зрізів тканин після їх сольобілізації визначали радіоактивність білків на рідинному сцинтиляційному лічильнику LKB (Швеція) у толуоловому сцинтиляторі [10]. Утворений в процесі інкубації зрізів тканин цестод $^{14}\text{CO}_2$ вловлювали 20 %-им розчином NaOH і також визначали його радіоактивність на рідинному сцинтиляційному лічильнику у толуоловому сцинтиляторі [10]. Статистичну обробку одержаних цифрових даних проводили на комп'ютері.

Результати й обговорення

У гомогенатах статевозрілих стьожаків — *Bothrioccephalus acheilognathi* сумарна концентрація ліпідів складала $6,65 \pm 0,57$ г/%. При порівнянні ліпідних фракцій у гомогенатах ботріоцефалюсів звертає на себе увагу значно більший вміст структурних компонентів: концентрація фосфоліпідів ($51,21 \pm 0,78$ %) та моно- і диацилгліцеролів ($19,98 \pm 0,42$ %). Рівень запасних ліпідів — триацилгліцеролів порівняно невеликий і складає $6,87 \pm 0,35$ %, а також рівень вільних жирних кислот — $6,64 \pm 0,23$ %, що свідчить про меншу їх роль в енергетичному забезпеченні. Концентрація етерифікованого холестеролу в гомогенатах дуже низька і складає $4,54 \pm 0,23$ %. Наведені порівняння концентрацій ліпідних фракцій у гомогенатах цестод показують, що кількість загальних ліпідів може зростати у *Bothrioccephalus acheilognathi* за рахунок вмісту фосфоліпідів і їх у 7,45 рази більше, ніж триацилгліцеролів. Незначний вміст триацилгліцеролів у дорослих форм, напевне, пов'язаний з тим, що паразитуючи в середовищі (організмі дефінітивного хазяїна — коропа) з низьким парціальним тиском кисню, гельмінт отримує необхідну енергію, головним чином за рахунок анаеробного розщеплення вуглеводів. Ліпіди в цих умовах використовуються обмежено [12].

Жирнокислотний склад загальних ліпідів гомогенатів ботріоцефалюсів характеризується значно вищим вмістом мононенасичених і насичених жирних кислот, ніж поліненасичених (табл. 1). Близько 75,0 % загального вмісту поліненасичених жирних кислот у гомогенатах гельмінтів становить лінолева кислота, яку гельмінти поглинають із хімусу кишечника риб. Як відомо, лінолева кислота не синтезується в організмі тварин. Джерелом ліноленої кислоти в організмі риб є природні корми, проте її вміст у ліпідах гомогенатів тканин ботріоцефалюсів у багато разів нижчий від вмісту лінолевої кислоти. Наявність у ліпідах гомогенатів ботріоцефалюсів C_{20} - і C_{22} -поліненасичених жирних кислот, які відсутні в кормах риб, свідчить про їх синтез у клітинах гомогенатів. Серед цих поліненасичених жирних кислот переважає докозагексаєнова кислота, а також у відносно великій кількості міститься докозапентаєнова і ейкозапентаєнова кислоти. 64,7 % загального вмісту жирних кислот у гомогенатах ботріоцефалюсів становить олеїнова кислота, близько 16,3 % — пальмітолеїнова кислота. Крім цих мононенасичених жирних кислот, у ліпідах гомогенатів гельмінтів містяться міристолеїнова, ейкозенова і нервонова кислоти. Серед насичених жирних кислот у загальних ліпідах гомогенатів ботріоцефалюсів переважає пальмітинова кислота, вміст якої становить приблизно 70 % від загального вмісту насичених жирних кислот. Далі виявлено зниження у ряді: стеаринова, міристинова, пентадеканова і маргарінова кислоти.

Жирнокислотний склад загальних ліпідів гомогенату ботріоцефалюсів (табл. 1) характеризується приблизно однаковим вмістом насичених і мононенасичених жирних

кислот, вміст яких становить у середньому, відповідно, 37,71 і 40,89 % від загального вмісту жирних кислот. Вміст поліненасичених жирних кислот у загальних ліпідах гомогенатів ботріоцефалюсів становить у середньому 20,40 % від загального вмісту жирних кислот. Вміст основних жирних кислот у загальних ліпідах ботріоцефалюсів знижується в ряді: олеїнова (27,58 %), пальмітинова (25,10 %), лінолева (14,58 %) і пальмітолеїнова (6,71 %), ейкозенова (4,17 %) і докозагексаєнова (2,45 %). Решта жирних кислот у загальних ліпідах гомогенатів ботріоцефалюсів містяться в мінорних кількостях. З цих даних випливає, що жирнокислотний склад загальних ліпідів відносно мало відрізняється від жирнокислотного складу загальних ліпідів у тканинах вищих тварин, у тому числі тканин цього літока коропа.

Таблиця 1

**Жирнокислотний склад загальних ліпідів гомогенатів ботріоцефалюсів
(*Bothriocephalus acheilognathi*), % (M±m, n=4)**

Назва жирної кислоти	Код жирної кислоти	Вміст жирних кислот, %
Міристинова	C _{14:0}	1,41±0,06
Міристолеїнова	C _{14:1}	0,70±0,08
Пентадеканова	C _{15:0}	1,47±0,04
Пальмітинова	C _{16:0}	25,10±0,84
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	6,71±0,24
Маргарінова	C _{17:0}	2,51±0,19
Гептенова	C _{17:1}	1,65±0,12
Стеаринова	C _{18:0}	7,22±0,30
Олеїнова	C _{18:1}	27,48±0,58
Лінолева	C _{18:2}	14,58±0,34
Ліноленова	C _{18:3}	0,39±0,03
Ейкозенова	C _{20:1}	4,17±0,31
Ейкозациєнова	C _{20:2}	1,22±0,07
Ейкозатриєнова	C _{20:3}	0,26±0,01
Ейкозатетраєнова	C _{20:4}	0,05±0,02
Ейкозапентаєнова	C _{20:5}	0,82±0,08
Докозатриєнова	C _{22:3}	0,13±0,01
Докозатетраєнова	C _{22:4}	0,65±0,05
Докозапентаєнова	C _{22:5}	0,85±0,09
Докозагексаєнова	C _{22:6}	2,45±0,08
Нервонова	C _{24:1}	0,18±0,04
Насичені жирні кислоти		37,71
Ненасичені жирні кислоти		62,29
Мононенасичені жирні кислоти		40,89
Поліненасичені жирні кислоти		21,40
Коефіцієнт насиченості		0,61

Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів у гомогенатах тканин ботріоцефалюсів істотно не відрізняється з їх вмістом у тканинах цього літока коропа. Так, вміст дієнових кон'югатів у них становить у середньому 165,8 мкмоль/г, вміст гідроперекисів ліпідів — 1,04 ОЕ/г, вміст малонового діальдегіду — 1,17 нмоль/г.

У гомогенатах статевозрілих сьомжаків — *Bothriocephalus acheilognathi* концентрація загального білка складала 13,80±0,57 г%, активність аланін- і аспартатамінотрансфераз, відповідно, 242,59±19,15 і 314,68±18,32 мкмоль пірувату/г тканини за годину та сечової кислоти 1,02±0,09 мкмоль/г тканини. У цьому відношенні метаболізм речовин у гомогенатах тканин ботріоцефалюсів є вищими, ніж у тканинах цього літока коропа (стінці кишечнику) [13], що свідчить про високу інтенсивність обміну білків в імагінальній стадії сьомжаків — *Bothriocephalus acheilognathi* та високу потребу його в амінокислотах.

Амінокислотний склад білків гомогенатів тканин ботріоцефалюсів (табл. 2) характеризується приблизно однаковим вмістом замічних і незамінних амінокислот, які

становлять, відповідно, 43,81 і 42,48 мг/г. Серед замічних амінокислот у загальних білках гомогенатів ботріоцефалюсів переважають глютамінова і аспарагінова кислоти, аланін і гліцин, серед незамінних амінокислот — лейцин і лізин. Вказані амінокислоти у найбільшій кількості містяться також у тканинах вищих тварин, у тому числі в цьоголіток коропа.

Таблиця 2

Амінокислотний склад білків у гомогенатах тканини *Bothriocephalus acheilognathi*, (M±m, n=4)

Амінокислоти	<i>Bothriocephalus acheilognathi</i>	
	мг/г	%
Кислота аспарагінова	8,98±0,16	10,41
Треонін□	3,87±0,29	4,48
Серин	3,86±0,10	4,47
Кислота глютамінова	12,07±0,81	13,99
Пролін	4,65±0,13	5,39
Гліцин	5,22±0,11	6,05
Аланін	6,25±0,10	7,24
Валін□	5,79±0,16	6,70
Метіонін□	1,85±0,08	2,14
Ізолейцин□	4,34±0,14	5,03
Лейцин□	8,15±0,10	9,44
Тирозин	2,78±0,08	3,22
Фенілаланін□	4,08±0,18	4,73
Лізин□	7,84±0,12	9,09
Гістидин□	1,49±0,10	1,73
Аргінін□	5,08±0,11	5,89
ВСЬОГО	86,29±3,41	100
Незамінні□	42,48	
Замінні	43,81	

Примітка: У таблиці □ позначені незамінні амінокислоти.

Наші дослідження показали, що *Bothriocephalus acheilognathi* в умовах *in vitro* використовує у синтезі білка як амінокислоти, які він поглинає з хімусу кишечника, так і амінокислоти, синтезовані з вуглецевого скелету глюкози *de novo*. Про це свідчить відносно висока радіоактивність білків (табл. 3) при інкубації гомогенатів ботріоцефалюсів як з [2-¹⁴C] лізином, так і з [6-¹⁴C] глюкозою. Порівняння даних дає змогу зробити висновок, що радіоактивність білків, синтезованих гомогенатами тканин ботріоцефалюсів при інкубації з [2-¹⁴C] лізином і [6-¹⁴C] глюкозою перебуває приблизно на такому ж рівні, як радіоактивність білків, синтезованих зрізами досліджуваних тканин цьоголіток коропа [14]. Ці дані свідчать про поглинання тканинами ботріоцефалюсів, утворених у кишечнику риб амінокислот і використання їх у синтезі білків, які утворюються в результаті розщеплення поживних речовин корму.

Таблиця 3

Радіоактивність білків і ¹⁴CO₂ при інкубації гомогенатів тканин ботріоцефалюсів з різними попередниками, міченими радіоактивним вуглецем, (M±m), β-розп./хв 100 мг тканини, (n=4)

Мічені попередники	Радіоактивність білків	Радіоактивність ¹⁴ CO ₂
[2- ¹⁴ C]лізин	23143±1086	176±16,4
[6- ¹⁴ C]глюкоза	28107±1226	254±16,2
[1- ¹⁴ C]пальмітинова кислота	—	431±28,1

З наведених даних видно (табл. 3), що радіоактивність CO₂, утвореного гомогенатами тканин ботріоцефалюсів при інкубації з [1-¹⁴C] пальмітиновою кислотою, значно вища, ніж

при інкубації з $[6-^{14}\text{C}]$ глюкозою і особливо при інкубації з $[2-^{14}\text{C}]$ лізином. З цього випливає, що ботріоцефалюси значно більшою мірою використовують в енергетичних процесах жирні кислоти, ніж глюкозу і амінокислоти. Загалом, отримані результати свідчать про високу інтенсивність синтезу білків і енергетичних процесів у клітинах ботріоцефалюсів, яка істотно не відрізняється від інтенсивності цих процесів у тканинах цьоголіток коропа.

Висновки

1. Вміст загальних ліпідів у тканинах імагінальної стадії стьожаків — *Bothriosephalus acheilognathi* зростає за рахунок концентрації фосфоліпідів — структурного компонента, якого в 7,45 рази більше, ніж триацилгліцеролів — депонованого пластичного резервуару. В жирнокислотному складі ліпідів з гомогенатів ботріоцефалюсів переважають жирні кислоти — олеїнова, пальмітинова, лінолева, стеаринова, пальмітолеїнова, частка яких становить 81,14 % від загальної кількості, що використовуються в обміні жирних кислот.

2. У складі білків імагінальної стадії стьожаків — *Bothriosephalus acheilognathi* серед замінних амінокислот переважають глутамінова і аспарагінова кислоти, аланін і гліцин, серед незамінних — лейцин і лізин. Інтенсивність синтезу білків у гомогенатах цестод *Bothriosephalus acheilognathi* при інкубації їх зрізів з $[6-^{14}\text{C}]$ глюкозою в 1,22 рази вища, ніж при інкубації з $[2-^{14}\text{C}]$ лізином. Інтенсивність окиснення $[1-^{14}\text{C}]$ пальмітинової кислоти у гомогенатах цестод *Bothriosephalus acheilognathi* в умовах *in vitro* в 1,70 рази вища, ніж при окисненні $[6-^{14}\text{C}]$ глюкози і в 2,45 рази вища, ніж при окисненні $[2-^{14}\text{C}]$ лізину.

Перспективи подальших досліджень. Інтенсивність обміну речовин і енергії у гельмінтів і їх хазяїв-риб будуть вивчатися за впливу внутрішніх (інтенсивність інвазії, вік) і зовнішніх факторів (годівля, пори року, екологічний стан водойм) з метою встановлення закономірностей енергосубстратно-кофакторної рівноваги і його значення для рибопродуктивності.

D. Yuskiv

THE FEATURES OF METABOLISM IN TISSUES ON IMAGINAL STAGE OF CESTODES — BOTHRIOSEPHALUS ACHEILOGNATHI

S u m m a r y

The article presents data on the metabolism of lipids, proteins, the intensity of protein synthesis using glucose, lysine, palmetic acid marked with radioactive isotope carbon and energy processes in the homogenate of mature worms cestodes — *Bothriosephalus acheilognathi*.

И. Д. Юськив

ОСОБЕНОСТИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ В ТКАНЯХ ИМАГИНАЛЬНОЙ СТАДИИ ЛЕНТЕЦОВ — BOTHRIOSEPHALUS ACHEILOGNATHI

А н н о т а ц и я

В статье приведены данные о метаболизме липидов, белков, интенсивности синтеза белка при использовании глюкозы, лизина, пальмитиновой кислоты, меченных радиоактивным углеродом и энергетические процессы в гомогенате половозрелой стадии лентецов-ремнецов — *Bothriosephalus acheilognathi*.

1. Секретарюк К. В. Морфофункциональные взаимоотношения в системе паразит-хозяин при ботриоцефалезе и филометраидозе карпа : автореф. дис... д-ра биол. наук : 03.00.20 / К. В. Секретарюк. — М., 1986. — 40 с.
2. Давыдов О. Н. Паразито-хозяйственные отношения при цестодозах рыб / О. Н. Давыдов, Л. Я. Куровская. — К. : Наук. думка, 1991. — 172 с.
3. Головина Н. А. Ихтиопатология / Н. А. Головина, Ю. А. Стрелков, В. Н. Воронин и др. — М. : Мир, 2007. — 448 с.
4. Folch J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues / J. Folch, M. Lees, S. G. Stanley // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol. 226, № 1. — P. 497–509.
5. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. — М. : Мир, 1975. — 322 с.
6. Сидоров В. С. Методы выделения тонкослойной и газожидкостной хроматографии липидов рыб / В. С. Сидоров, Е. И. Лизенко, О. М. Болгова // Типовые методики исслед. продуктивности видов рыб в пределах их ареалов. — Вильнюс, 1981. — Ч. 4. — С. 58–68.
7. Марцишаускас Р. П. Определение белков по методу Лоури в разных модификациях // Методы в биохимии : матер. к II съезду биохим. Латвийской ССР / Р. П. Марцишаускас, Л. Э. Тарасявичене, С. И. Канопкайте. — Вильнюс, 1975. — С. 5–12.
8. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике : справочник / В. В. Меньшиков, Л. Н. Делекторская, Р. П. Золотницкая и др. ; под ред. В. В. Меньшикова. — М. : Медицина, 1987. — 368 с.
9. Масленникова Н. В. Определение аминокислотного состава тканей тела рыб / Н. В. Масленникова // Типовые методики исслед. продуктивности видов рыб в пределах их ареалов. — Вильнюс, 1981. — Ч. IV. — С. 40–46.
10. Вовк С. И. Исследование синтеза белков в тканях сельскохозяйственных животных : методические рекомендации / С. И. Вовк, В. Г. Янович. — Львов, 1988. — 20 с.
11. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. И. Прохоровой. — Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. — 272 с.
12. Brand T. Biochemistry of parasites / T. Brand. — New York, London, 1996. — 680 p.
13. Юськів І. Д. Вплив цестої *Bothriocephalus acheilognathi* на білковий обмін у стінці кишечника цьогорічок коропа / І. Д. Юськів // Вісник Дніпропетровського ДАУ. — Дніпропетровськ, 2005. — Вип. 2. — С. 35–38.
14. Юськів І. Д. Інтенсивність синтезу білків *in vitro* у тканинах цьогорічок коропа при ботріоцефальозі / І. Д. Юськів, Л. Л. Юськів // Науковий вісник ЛНАВМ ім. С. З. Гжицького. — Львів, 2005. — Т. 7, № 3 (26). — Ч. 2. — С. 170–173.

Рецензент: головний науковий співробітник лабораторії живлення ВРХ, доктор біологічних наук, професор Янович В. Г.