

УДК 595.122:597.556

## ТРЕМАТОДА *AZYGIA LUCII* И ЩУКА *ESOX LUCIUS*: ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОТНОШЕНИЙ

© 2025 г. Т. В. Фролова<sup>®</sup>, А. С. Соколова, Г. И. Извекова

Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН, п. Борок, Ярославская обл., 152742 Россия

<sup>®</sup>E-mail: bianca28061981@gmail.com

Поступила в редакцию 24.04.2024 г.

После доработки 21.01.2025 г.

Принята к публикации 24.01.2025 г.

Исследовано влияние заражения трематодами *Azygia lucii* на активность протеолитических ферментов, функционирующих в желудке хозяина—щуки, и способность червей ингибировать эту активность. В желудке щуки обнаружена активность широкого спектра протеаз. В экстрактах марит *A. lucii* определена как пепсиноподобная активность, так и активность щелочных протеаз, большая доля которых приходится на металл-зависимые протеазы. Даже при невысокой интенсивности инвазии трематоды вызывают повышение активности пепсиноподобных протеаз в желудке хозяина. Экстракт червей ингибирует активность коммерческого пепсина, но ни среда инкубации, ни экстракт трематод не оказывают статистически значимого ингибирующего эффекта на активность пепсиноподобных протеаз слизистой оболочки желудка щуки.

**Ключевые слова:** трематоды, паразит, хозяин, пепсиноподобные и щелочные протеазы, ингибиторы протеаз

**DOI:** 10.31857/S1026347025040013

Мариты *Azygia lucii* (Müller, 1776) Lühe, 1909 — самые крупные трематоды—паразиты пресноводных рыб, и, вероятно, лидируют по продолжительности жизни (Жохов, Пугачева, 2023). В жизненном цикле трематоды *A. lucii* присутствуют два хозяина, окончательными служат пресноводные хищные рыбы, в желудке и пищеводе которых паразитируют мариты *A. lucii*. По данным А.Е. Жохова и М. Н. Пугачевой (2023), интенсивность инвазии марит, как правило, составляет 1–3 экземпляра, длина их тела колеблется от 0.49 до 3.5 см. *A. lucii* паразитирует в щуке *Esox lucius* Linnaeus, 1758 на западе (Европейская часть России, бассейн реки Волги) и севере (Западная Сибирь, бассейн реки Обь) России (Vainutis *et al.*, 2023). Азигииды — малоизученная группа трематод, об эпидемиологии, популяционной экологии и филогении которых известно не много (Vainutis *et al.*, 2023). Сведения о каких-либо физиологических характеристиках этих трематод, так же как об их влиянии на физиологические характеристики хозяев в доступной литературе отсутствуют.

Многие виды трематод, вызывающие заболевания человека и животных, исследуются очень активно (Swiklinski, Dalton, 2018; Dvorak, Horn, 2018). Большое число исследований касается взаимоотношений в системе трематоды — промежуточные

хозяева—моллюски, но не мариты трематод — окончательный хозяин—позвоночное животное.

Известно, что заражение паразитами может быть одним из факторов, влияющих на уровень активности пищеварительных ферментов хозяев. Например, для цестод, паразитирующих в кишечнике, в том числе в кишечнике рыб, характерно активное взаимодействие с пищеварительной системой хозяина и влияние на нее в силу морфологического сходства их тегумента с энтероцитами кишечника, а также большей, по сравнению с другими гельминтами, биомассы и площади поверхности, принимающей участие в пищеварительно-транспортных процессах (Izvekova, Solovyev, 2012, 2013). Установлено, например, что у щук, зараженных цестодами *Triaenophorus nodulosus* Pallas, 1781 вдоль всего кишечника общая протеолитическая активность выше, чем у незараженных, в то время как на уровне активности амилазы, липаз и эстераз инвазия не влияет. Отмечено изменение соотношения уровней активности протеаз и амилазы в кишечнике в сторону увеличения протеолитической, а также повышение уровня белка в гепатопанкреасе зараженных рыб (Izvekova, Solovyev, 2012). По нашим наблюдениям часто заражение щук *A. lucii* в весенний период сопровождается инвазией цестод *T. nodulosus*.

Пищеварительные ферменты всех позвоночных животных, в том числе рыб, характеризуются определенной локализацией в стенке и вдоль желудочно-кишечного тракта. Как правило, распределение и уровень активности этих ферментов варьируют в зависимости от типа питания и морфологии кишечника рыб (Izvekova *et al.*, 2011). Среди пищеварительных ферментов существенное значение играют протеазы, расщепляющие пептидные связи. Большое разнообразие протеолитических ферментов связано с различными условиями их функционирования. Кроме того, протеазы, как правило, имеют решающее значение для паразитизма, поскольку они участвуют в таких процессах, как проникновение в хозяина, получение питательных веществ, а также уклонение от иммунитета и модулирование физиологии хозяина (Pearson *et al.*, 2010; Fernández-Delgado *et al.*, 2017; Dvorak, Horn, 2018).

Стоит отметить, что ингибиторы протеаз не менее важны, поскольку они сдерживают потенциально опасную избыточную или несвоевременную протеолитическую активность. Ингибиторы известны для протеаз всех классов (Ranasinghe, McManus, 2017). Несмотря на эпидемиологическую значимость многих трематод (Cwiklinski, Dalton, 2018; Dvorak, Horn, 2018), об их ингибиторах протеаз информации недостаточно. Характеристика ингибиторов протеаз важна не только для расширения знаний о биологии паразитических трематод, но и в поиске новых мишеней для вакцин и/или лекарств (Ranasinghe, McManus, 2017).

В связи с вышесказанным целью работы — исследовать влияние заражения трематодами *A. lucii* на активность протеолитических ферментов, функционирующих в желудке хозяина — щуки, и способность червей ингибировать эту активность.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Объект исследований*

Объектом исследований служили трематоды *A. lucii* из желудка щуки *E. lucius*. Исследованы черви из 26 шук размером 325–640 мм, выловленных в зимний и весенний период 2021–2022 гг. в Рыбинском водохранилище. Рыб отлавливали сетями, доставляли в лабораторию в специальных емкостях с водой. Вскрытие рыб, их желудков, извлечение червей и приготовление различных препаратов производили на ледяной бане.

### *Приготовление экстрактов*

Желудки рыб вскрывали, извлекали червей и помещали в раствор Рингера для холоднокровных животных (6 г NaCl; 0.14 г KCl; 0.5 мл 10% CaCl<sub>2</sub>; 0.54 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.02 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.16 г MgSO<sub>4</sub>

в 1 л дистиллированной воды), pH 4.5. Из всех извлеченных червей были сформированы пять навесок массой 0.11–0.18 г, каждая из которых инкубировалась в 500 мкл раствора Рингера в течение 24 ч при 7 °С. В течение всего времени инкубации черви оставались живыми. По истечении времени инкубации черви были извлечены из раствора. Из слизистой оболочки желудка рыб готовили индивидуальные экстракты — из пяти незараженных и пяти зараженных особей.

Из червей и слизистой оболочки желудка рыб экстрагировали водорастворимые белки: навеску червей гомогенизировали с помощью гомогенизатора Ultra-Turrax (Ika, Германия) в массово-объемном соотношении 1 : 4 с раствором Рингера (pH 4.5), навеску слизистой оболочки — в соотношении 1 : 49 с раствором Рингера (pH 6,5). Гомогенаты червей и слизистой оболочки центрифугировали при 7500 г в течение 5 мин при 4 °С. Для биохимических исследований использовали полученные супернатанты (экстракты).

### *Определение общего растворимого белка*

Количество общего белка в среде инкубации, экстрактах червей и слизистой оболочки желудка рыб определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976). В лунку планшета вносили 30 мкл образца и 270 мкл раствора Бредфорда. Через 5 мин определяли интенсивность окрашивания на планшетном спектрофотометре FlexA-200 (Allsheng, Китай) при длине волны 595 нм.

### *Определение протеолитической активности*

Суммарную активность щелочных протеаз (преимущественно трипсина КФ 3.4.21.4, химотрипсина КФ 3.4.21.1 и дипептидаз КФ 3.4.13.18) в экстрактах червей и слизистой оболочки желудка рыб определяли с использованием в качестве субстрата 0.3% раствора азо-казеина (арт. 11610, Sigma-Aldrich) в *трис*-HCl буфере, pH 7.5 для трематод, pH в диапазоне значений от 3.5 до 7.5 для рыб (Alarcón *et al.*, 2002). Экстракт (50 мкл) и субстрат (100 мкл) инкубировали 60 мин при 20–22 °С, реакцию останавливали 100 мкл 0.3 М раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием в течение 5 мин при 7500 г. Интенсивность развивающегося окрашивания измеряли на спектрофотометре при 425 нм (Nolasco-Soria, 2021). В холостую пробу вместо экстракта добавляли такой же объем раствора Рингера, pH 4.5 для трематод и pH 6.5 для рыб. В серии специальных опытов была определена активность протеаз слизистой оболочки желудка щуки по отношению к азо-казеину при различных значениях pH среды (от 3.5 до 7.5). Единицы протеолитической активности (ЕА) вычисляли по формуле:  $EA = \Delta/mT$ , где

$\Delta$  – разница показаний спектрофотометра пробы с субстратом и холостой пробы;  $m$  – навеска червей или слизистой оболочки желудка рыб, г;  $T$  – время инкубации, мин.

Определение активности кислых протеаз (преимущественно пепсина, КФ 3.4.23.1) в экстрактах червей и слизистой оболочке желудка незараженных и зараженных рыб–хозяев проводили с использованием в качестве субстрата 0.5% раствора гемоглобина в 0.2 М глициновом буфере, рН 3.0 (Worthington, 1991). Экстракт (25 мкл) и субстрат (250 мкл) инкубировали 15 мин при температуре 20–22 °С. Реакцию останавливали добавлением 500 мкл 5% раствора ТХУ, образовавшийся осадок удаляли центрифугированием в течение 6 мин при 4000 г и температуре 4 °С. Пепсиноподобную активность определяли по приросту тирозина на спектрофотометре при 280 нм и вычисляли по формуле:  $EA = \Delta/\varepsilon TV$ , где  $\Delta$  – разница показаний спектрофотометра пробы с субстратом и холостой пробы;  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции тирозина;  $T$  – время инкубации, мин;  $V$  – объем экстракта, мл.

#### *Ингибиторный анализ протеаз*

Определение активности различных подклассов щелочных протеаз, функционирующих у марины трематод и в слизистой оболочке желудка щуки, проводили с использованием следующих ингибиторов: 1) фенил-метил-сульфонил-фторид (PMSF) – ингибитор сериновых протеаз, 100 мМ в диметилсульфоксиде (DMSO); 2) этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) – ингибитор металл-зависимых протеаз, 0.5 М в 1 М NaOH; 3) E-64 – ингибитор цистеиновых (тиоловых) протеаз, 1 мМ в дистиллированной воде (Michaud, 1998).

Активность различных подклассов щелочных протеаз определяли по следующей схеме: к 50 мкл экстракта червя или слизистой оболочки желудка щук добавляли 5 мкл ингибитора и инкубировали в течение 15 мин при температуре 20–22 °С. Одновременно в соответствующую контрольную пробу вносили аналогичный объем трис-НСl буфера, рН 3.5 для рыб и рН 7.5 для трематод. После инкубации определяли остаточную активность щелочных протеаз как описано выше.

Определение доли пепсиноподобных протеаз в экстрактах червей и слизистой оболочке желудка рыб проводили, сравнивая общую гемоглоблин-литическую активность экстрактов и остаточную активность в присутствии пепстатина – ингибитора аспартатных (включая пепсин) протеаз. Остаточную активность оценивали после 15 мин преинкубации 25 мкг экстракта с 5 мкг 0.01 мМ раствора ингибитора в DMSO при температуре 20–22 °С. Одновременно в соответствующую контрольную пробу вносили аналогичный объем

глицинового буфера, рН 3.0. После инкубации проводили определение активности пепсиноподобных протеаз как указано выше.

#### *Определение ингибирующей способности трематод*

При определении ингибирующей активности червей источником протеаз служили экстракт слизистой оболочки желудка щуки и коммерческий препарат пепсина (арт. GRM084, Himedia) в концентрации 1 мг/мл в 0.2 М глициновом буфере, рН 3. Для определения ингибирующей способности в опытную среду, содержащую 25 мкл ферментативно активного препарата (в контрольной пробе – буфера), добавляли 5 мкл инкубационной среды или экстракта червей и инкубировали в течение 15 мин при температуре 20–22 °С. После инкубации в пробах определяли остаточную активность пепсина как описано выше. При расчете из показателя остаточной активности пепсина после добавления среды инкубации или экстракта *Azygia lucii* вычитали показатель собственной пепсиноподобной активности паразита в цельном экстракте или инкубационной среде.

Расчеты активности всех исследованных ферментов проводили двумя способами: на единицу (г) влажной массы ткани (общая ферментативная активность) и на единицу (мг) белка, содержащегося в г влажной массы ткани (удельная активность).

Все биохимические определения проводили в трех технических повторностях.

#### *Статистическая обработка*

Результаты представлены в виде средних и их стандартных ошибок. Обработка результатов выполнена с помощью статистических пакетов “Microsoft Excel 2010” и STATISTICA 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Число червей в одной щуке колебалось от 1 до 13 экз. Средняя интенсивность инвазии составила 3.8, индекс обилия – 2.8, а экстенсивность инвазии – 73.1%.

Поскольку марины трематод обладают пищеварительной системой, исследована активность протеаз в их экстракте. В экстракте *A. lucii* обнаружена активность щелочных и пепсиноподобных протеаз (рис. 1, 2). Ингибиторный анализ позволил установить соотношение активностей этих протеаз в экстрактах *A. lucii* (табл. 1, рис. 1); оказалось, что среди протеолитических активностей у червей преобладает металл-зависимая.

Определение активности пепсиноподобных протеаз в желудке незараженных и зараженных

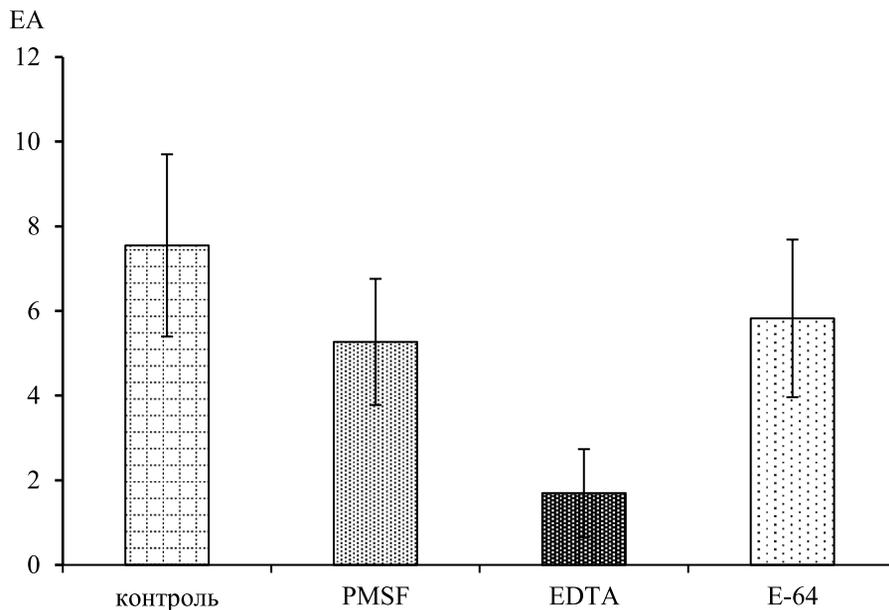


Рис. 1. Ингибиторный анализ протеаз марит *Azugia lucii*, n = 5.

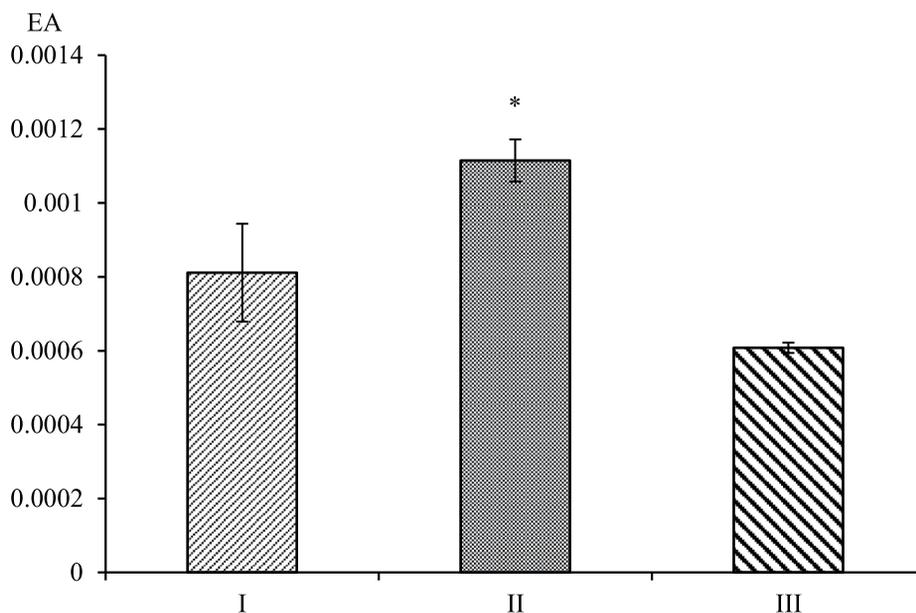


Рис. 2. Пепсиноподобная активность слизистой оболочки желудка не зараженных (I), зараженных (II) щук и экстракта трематоды *Azugia lucii* (III), n = 5. \* указывает на достоверность различия зараженных щук относительно не зараженных.

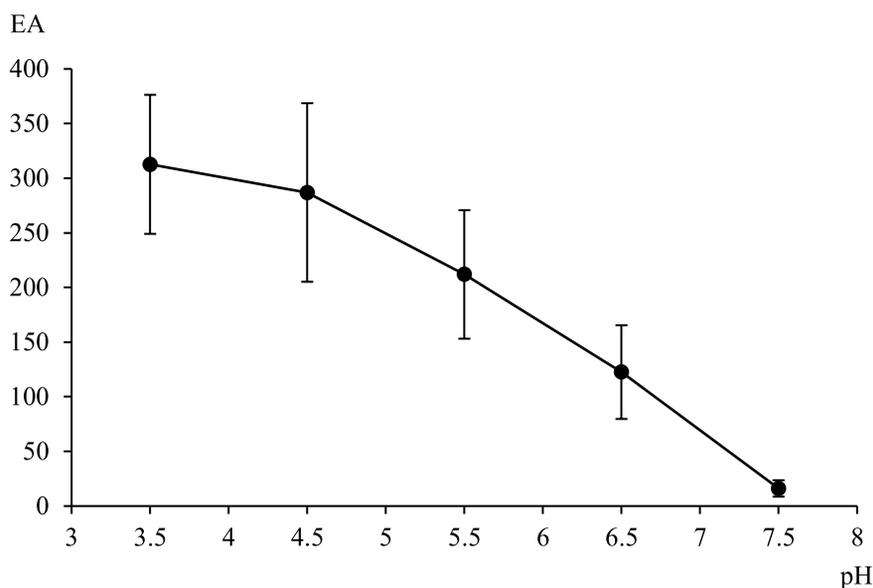
трематодами щук показало, что при заражении *A. lucii* активность этих ферментов слизистой оболочки желудка хозяина—щуки повышается ( $p = 0.033$ ) (рис. 2). При этом уровни абсолютной активности пепсиноподобных протеаз у паразита и хозяина сопоставимы.

Кроме того, определена протеолитическая активность слизистой оболочки желудка щуки

по отношению к азо-казеину при значениях рН среды 3.5–7.5 (рис. 3). Установлено, что заражение маридами *A. lucii* не влияет на эту активность, при увеличении значений рН от 3.5 до 7.5 общая протеолитическая активность в желудке щуки снижается в 19 раз (рис. 3). Стоит отметить, что при значении рН среды 7.5 общая протеолитическая активность у трематоды в 2 раза меньше,

**Таблица 1.** Процент ингибирования (%) активности протеолитических ферментов из желудка щуки и марит *Azygia lucii*

Ингибитор		пепстатин	PMSF	ЭДТА	Е-64
Процент (%) ингибирования	щука	52.8 ± 9.5	2.9 ± 2.3	99.9 ± 0.01	12.3 ± 4.5
	<i>A. lucii</i>	3.8 ± 1.6	29.6 ± 2.3	79.3 ± 7.8	24.5 ± 3.1

**Рис. 3.** Влияние pH среды на общую протеолитическую активность слизистой оболочки желудка щуки, n = 5.

чем у хозяина ( $7.55 \pm 2.15$  и  $16.13 \pm 7.52$  ЕА соответственно). В то время как при расчете удельной активности она различается на три порядка ( $55.97 \pm 14.43$  и  $17.1 \cdot 10^3 \pm 7.0 \cdot 10^3$  ЕА/мг белка соответственно).

Ингибиторный анализ показал, что как у незараженных ( $48.9 \pm 20.6\%$ ), так и у зараженных ( $56.1 \pm 6.6\%$ ) щук пепстатином ингибируется значительный процент активности протеолитических ферментов слизистой оболочки желудка, активных при кислых значениях pH, (табл. 1), что свидетельствует о высоком уровне пепсиноподобной активности в желудке щук. Значительный процент общей протеолитической активности слизистой оболочки желудка щуки по отношению к азо-казеину, как и у трематод, обусловлен активностью металл-зависимых протеаз (рис. 4, табл. 1), в то время как на активность сериновых протеаз у хозяина приходится около 3% общей протеолитической активности.

Проверка способности среды инкубации и экстракта трематод *A. lucii* ингибировать протеолитическую активность слизистой оболочки желудка щуки и коммерческого препарата пепсина показала отсутствие статистически значимого ингибирующего эффекта среды инкубации и экстракта этой трематоды на активность

пепсиноподобных протеаз слизистой оболочки желудка щуки. В то же время экстракт червей достоверно ингибирует активность коммерческого пепсина ( $p < 0.05$ ) (рис. 5).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Трематоды — паразиты с долгой историей совместной эволюции со своими хозяевами. Их физиологические процессы полностью адаптированы для паразитизма, включая проникновение в хозяина, питание и успешное размножение. Эти очень специфические приспособления к конкретным хозяевам требуют биоактивных молекул, и среди них протеаз как ферментов, способных гидролизовать белки и пептиды в качестве необходимого условия стратегии выживания (Dvorak, Horn, 2018). Взаимодействие паразит—хозяин включает комплекс различных реакций, состоящих из молекул, продуцируемых обоими партнерами. Вторгаться, мигрировать и выживать внутри хозяина гельминтам помогает ряд их экскреторно/секреторных белков (Swiklinski, Dalton, 2018). Известно, что трематоды переваривают белки с участием ряда катепсин-подобных цистеиновых и аспартатных протеаз, которые гидролизуют эти белки до усваиваемых пептидов, далее

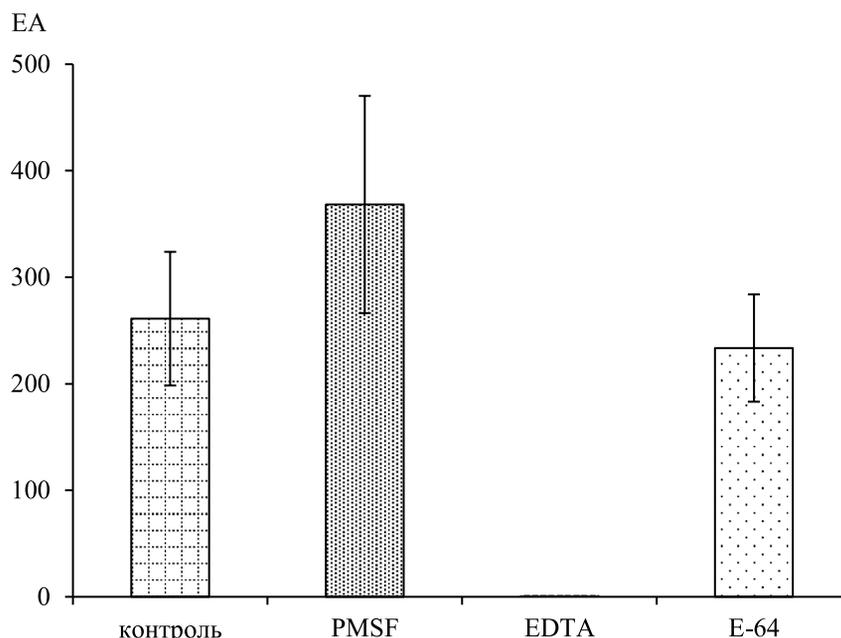


Рис. 4. Ингибиторный анализ протеаз, функционирующих в слизистой оболочке желудка щуки,  $n = 5$ .

гидролизуемых до аминокислот внутриклеточными аминопептидазами (Dalton *et al.*, 2004; Delcroix *et al.*, 2006). Пищеварение – сложный физиологический процесс, в ходе которого пищеварительные ферменты расщепляют полимерные макромолекулы на более мелкие единицы, тем самым облегчая и улучшая усвоение питательных веществ. Среди всех ферментов протеазы – наиболее важные ферменты для переваривания белка (Delcroix *et al.*, 2006).

Проведенные исследования позволили установить, что в экстрактах марит трематод *A. lucii* проявляют активность различные протеазы: пепсиноподобные, сериновые, цистеиновые и металл-зависимые. Обнаружение активности широкого спектра протеаз у исследованных червей может служить доказательством их способности переваривать пищу различного состава.

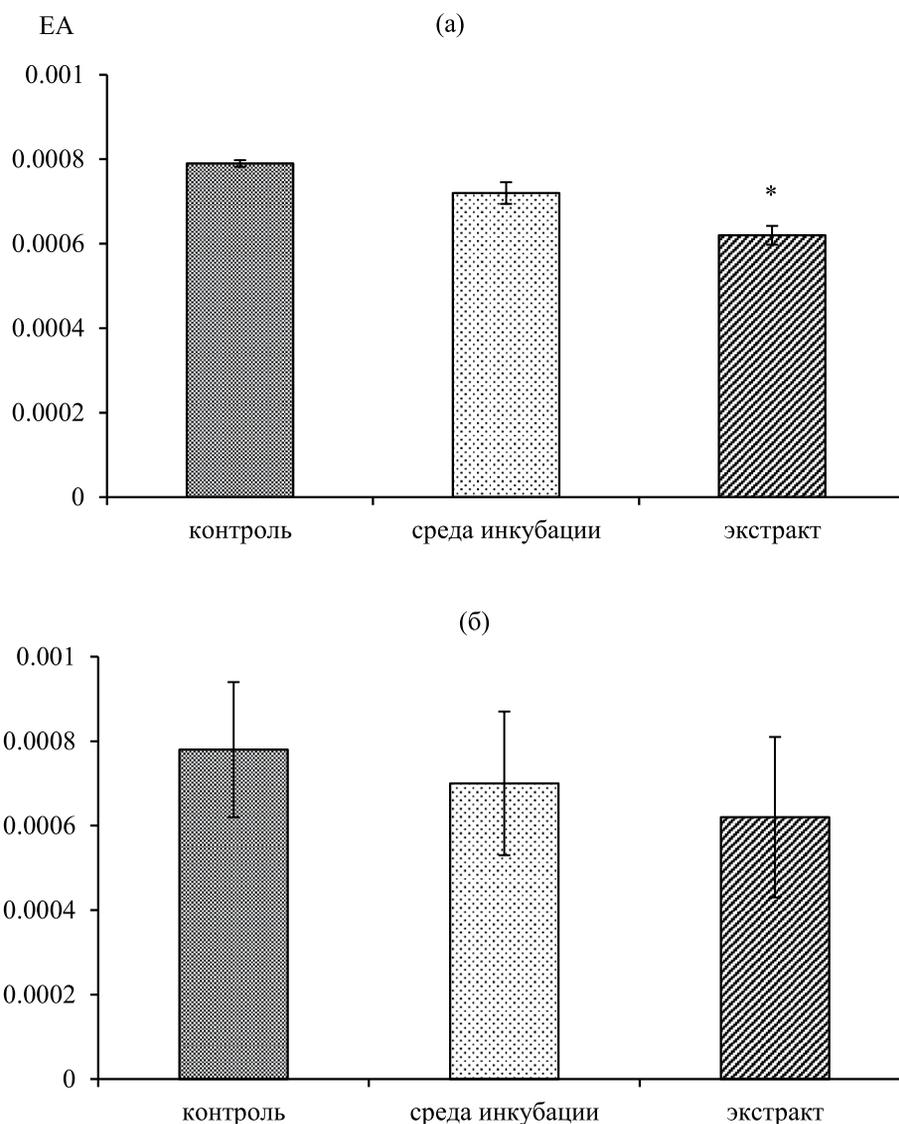
Ингибирование протеолитической активности слизистой оболочки желудка щуки пепстатином свидетельствует о присутствии в нем пепсиноподобных протеаз. Поскольку в экстракте *A. lucii* обнаружена достаточно высокая, сравнимая с аналогичной активностью в желудке незараженных хозяев, активность пепсиноподобных протеаз, можно предположить, что увеличение активности этих ферментов в желудке зараженных трематодами щук обусловлено активностью ферментов червей. Существование аспартатных протеаз обнаружено и у других трематод, в частности, у *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Bos *et al.*, 2009).

Известно, что сериновые протеазы трематод представляют собой разнообразную и сложную группу протеолитических ферментов, которые

могут прямо или косвенно участвовать во взаимодействиях паразит–хозяин и в физиологических процессах паразитов (Dvorak, Horn, 2018). По нашим данным, до 30% протеолитической активности у марит трематод *A. lucii* обеспечивается сериновыми протеазами.

Считается, что цистеиновые протеазы играют ключевую роль в переваривании белков хозяина гельминтами, предположительно расширяя круг субстратов, на которые они действуют, не в последнюю очередь при миграции паразита через ткани хозяина (Caffrey *et al.*, 2018). Установлено, что у *A. lucii* доля цистеиновых протеаз достигает 24.5%, т.е. почти четвертой части активности всех протеолитических ферментов, что согласуется со сведениями о важной роли этого подкласса протеаз в жизнедеятельности исследованных червей.

Ингибирование общей протеолитической активности ЭДТА указывает на присутствие протеаз, для действия которых необходимы ионы металлов. К этим ферментам относятся кальпаин, связывающийся с ионами кальция для активации (Высоцкая, Немова, 2008), металлоферменты, содержащие в активном центре атом металла (чаще  $Zn^{2+}$ ), большинство известных пептидаз и протеазы, продуцируемые микроорганизмами (Номенклатура ферментов, 1979; Rawlings, Barrett, 1993). В настоящее время к металл-зависимым протеазам отнесены 28 протеаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса. Эти протеазы участвуют в большинстве воспалительных, аутоиммунных, онкологических и патогенных заболеваний (Kolyaskin, Shibeko, 2024). Активность металл-зависимых



**Рис. 5.** Влияние среды инкубации и экстракта марит *Azygia lucii* на активность пепсина (а) и пепсиноподобную активность слизистой оболочки желудка щуки (б),  $n = 5$ . \* указывает на достоверность различия экстракта относительно контроля.

протеаз у исследованной трематоды, возможно, в основном обусловлена протеазами микроорганизмов, количественный и качественный состав которых в желудочно-кишечном тракте рыб достаточно широк и изменчив (Kashinskaya *et al.*, 2021). Более того, например, для сига *Coregonus lavaretus* Linnaeus, 1758 показано, что наибольшее разнообразие микробиоты пищеварительного тракта обнаруживается в его желудке (Kashinskaya *et al.*, 2023).

По мнению некоторых авторов, отдельные щуки с возрастом в результате каннибализма накапливают значительное количество трематод *A. lucii* (Жохов, Пугачева, 2023). По данным этих авторов интенсивность инвазии *A. lucii* в щуке может достигать до  $10.1 \pm 4.36$ . В случае высокой

интенсивности инвазии влияние трематод на активность протеаз желудка хозяина может быть более значительным, чем установленное в наших экспериментах со щукой с этим достаточно низким показателем.

Следует отметить, что в исследуемый период, кроме трематод в желудке, в кишечнике щуки присутствовали цестоды *T. nodulosus* различной степени зрелости. Длина этих цестод колеблется от 100 до 200 мм. В кишечнике щуки черви обитают в среднем отделе. При исследовании активности гидролитических ферментов в кишечнике щуки установлено, что активность протеаз повышается, а амилазы понижается от первого к пятому отделу, в то время как активность липаз и эстераз

вдоль кишечника колеблется в небольших пределах (Izvekova, Solovyev, 2012). Заражение *T. nodulosus* заметно влияет только на активность протеаз — у зараженных щук вдоль всего кишечника общая протеолитическая активность выше, чем у незараженных (Izvekova, Solovyev, 2012). Известно, что снижение патогенности паразита обуславливает длительное существование системы паразит — хозяин. Это позволяет паразиту успешно завершить развитие, поскольку нормально функционирующий организм хозяина обеспечивает наилучшие условия для этого процесса (Добровольский и др., 1994). Если принять во внимание, что как в желудке при заражении *A. lucii*, так и в кишечнике при заражении *T. nodulosus* повышается активность пепсиноподобных и щелочных протеаз соответственно, то можно прийти к достаточно спорному заключению, что заражение “выгодно” хозяину, поскольку возрастает активность наиболее значимых пищеварительных ферментов, что, в свою очередь, может привести к улучшению усвояемости пищи.

Полученные данные о влиянии трематод *A. lucii* на активность протеаз желудка щуки подтверждают представления о развитии отношений в системе паразит — хозяин, проявляющемся в уравнивании и стабилизации взаимного воздействия, а именно в снижении патогенности паразита и повышении устойчивости хозяина (Сопрунов, 1987). Маритам приходится противостоять достаточно агрессивным условиям среды — активности как пепсиноподобных, так и щелочных протеаз, функционирующих в желудке хозяина. Очевидно, ингибирующей способности *A. lucii* по отношению к пепсину достаточно, чтобы не подвергаться действию этих ферментов хозяина. Эти данные согласуются со сведениями других авторов, обнаруживших в секреторных продуктах *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 ингибиторы некоторых катепсинов, а также цистеиновых протеаз хозяина (Smith *et al.*, 2020). Ингибиторы протеаз играют важную роль в развитии инфекций и воспалительных заболеваний. Известно, что ингибиторы протеаз паразитов создают более безопасную среду в организме хозяина за счет ингибирования и регулирования активности протеаз и иммуномодуляции. Они играют решающую роль в развитии и выживании паразитов, противодействуя потенциально опасным иммунным реакциям их позвоночных хозяев (Ranasinghe, McManus, 2017).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований обнаружена активность широкого спектра протеаз, функционирующих в желудке щуки и у трематод *A. lucii*. Показано, что экстракты марит трематод

*A. lucii* проявляют как пепсиноподобную активность, так и активность щелочных протеаз, большая часть которых приходится на металл-зависимые протеазы. Такой широкий спектр протеаз может служить доказательством способности этих трематод переваривать пищу различного состава. Установлено повышение активности пепсиноподобных протеаз в желудке хозяина даже при низкой интенсивности инвазии. Это может указывать на участие ферментов трематод в общей активности пепсиноподобных протеаз. В то же время заражение не оказывает статистически значимого влияния на активность щелочных протеаз. Установлено, что экстракт червей ингибирует активность коммерческого пепсина, но ни среда инкубации, ни экстракт трематод не оказывали статистически значимого ингибирующего эффекта на активность пепсиноподобных протеаз слизистой оболочки желудка щуки. Однако очевидно, ингибирующей способности *A. lucii* по отношению к пепсиноподобным протеазам достаточно, чтобы не подвергаться агрессивному действию этих ферментов в организме хозяина.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания (тема № 124032500018-8).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, принципам Базельской декларации и рекомендациям Комиссии по биоэтике Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук (Протокол № 4 от 02.04.2021 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Высоцкая Р.У., Немова Н.Н. Лизосомы и лизосомальные ферменты рыб. М.: Наука, 2008. 284 с.  
Добровольский А.А., Евланов И.А., Шульман С.С. Паразитарные системы: анализ структуры и стратегии,

- определяющих их устойчивость / Экологическая паразитология [Ред. С. С. Шульман]. Петрозаводск: КНЦ РАН, 1994. 198 с.
- Жохов А. Е., Пугачева М. Н. Факторы, влияющие на распределение *Azygia lucii* в популяции дефинитивного хозяина // Биология внутренних вод. 2023. № 1. С. 115–124.  
<https://doi.org/10.31857/S0320965223010205>
- Номенклатура ферментов / Под ред. Браунштейна А. Е. М.: ВИНТИ, 1979. 324 с.
- Сопрунов Ф. Ф. Молекулярные основы паразитизма. М.: Наука, 1987. 224 с.
- Alarcon F.J., Martínez T.F., Barranco P., Cabello T., Díaz M., Moyano F.J. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae) // Insect Biochem. Mol. Biol. 2002. V. 32. P. 265–274.  
[https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00087-X)
- Bos D.H., Mayfield C., Minchella D.J. Analysis of regulatory protease sequences identified through bioinformatic data mining of the *Schistosoma mansoni* genome // BMC Genomics. 2009. № 10:488.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-488>
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Caffrey C.R., Goupil L., Rebello K.M., Dalton J.P., Smith D. Cysteine proteases as digestive enzymes in parasitic helminths // PLoS Negl. Trop. Dis. 2018. V. 12(8):e0005840.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005840>
- Cwiklinski K., Dalton J.P. Advances in *Fasciola hepatica* research using ‘omics’ technologies // Int. J. Parasitol. 2018. V. 48. P. 321–331.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.12.001>
- Dalton J.P., Skelly P., Halton D.W. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic plathyhelminths // Can. J. Zool. 2004. V. 82. P. 211–232.  
<https://doi.org/10.1139/z03-213>
- Delcroix M., Sajid M., Caffrey C.R., Lim K.-C., Dvorak J., Hsieh I., Bahgat M., Dissous C., McKerrow J.H. A Multienzyme Network Functions in Intestinal Protein Digestion by a Platyhelminth Parasite // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 51. P. 39316–39329.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M607128200>
- Dvorak J., Horn M. Serine proteases in schistosomes and other trematodes // Int. J. Parasitol. 2018. V. 48. P. 333–344.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.01.001>
- Izvekova G.I., Solovyev M.M. Activity of Digestive Hydrolyases in Fish Infected with Cestodes // Biol. Bull. Rev. 2013. V. 3. № 2. P. 167–175.  
<https://doi.org/10.1134/S2079086413020047>
- Izvekova G.I., Solovyev M.M. The activity of digestive enzymes of the pike *Esox lucius* L. infected with the cestode *Triaenophorus nodulosus* (Pallas) // Inland Water Biol. 2012. V. 5. № 1. P. 113–118.  
<https://doi.org/10.1134/S1995082911040080>
- Izvekova G.I., Solovyev M.M., Izvekov E.I. Effect of *Caryophyllaeus laticeps* (Cestoda, Caryophyllidae) upon Activity of Digestive Enzymes in Bream // Biol. Bull. 2011. V. 38, № 1. P. 50–56.  
<https://doi.org/10.1134/S1062359011010055>
- Fernández-Delgado M., Cortez J., Sulbarán G., Matos C., Incani R.N., Ballén D.E., Cesari I.M. Differential distribution and biochemical characteristics of hydrolases among developmental stages of *Schistosoma mansoni* may offer new anti-parasite targets // Parasitol. Int. 2017. V. 66. P. 816–820.  
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.09.015>
- Kashinskaya E.N., Simonov E.P., Izvekova G.I., Baturina O.A., Solovyev M.M. Variability of Composition of Microbiota of Gastrointestinal Tract of Perch *Perca fluviatilis* and Prussian Carp *Carassius gibelio* During the Vegetative Season // J. Ichthyology. 2021. V. 61. № 6. P. 955–971.  
<https://doi.org/10.1134/s0032945221060060>
- Kashinskaya E.N., Simonov E.P., Poddubnaya L.G., Vlasenko P.G., Shokurova A.V., Parshukov A.N., Andreeva K.B., Solovyev M.M. Trophic diversification and parasitic invasion as ecological niche modulators for gut microbiota of whitefish // Front. Microbiol. 2023. V. 14:1090899.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1090899>
- Kolyaskin L. Yu., Shibeko A.M. The Role of Metalloproteinases in the Development of Ischemia-Induced Pathologies of the Blood–Brain Barrier // J. Evol. Biochem. Physiol. 2024. V. 60. № 1. P. 228–246.  
<https://doi.org/10.31857/S0869813924010021>
- Michaud D. Gel electrophoresis of proteolytic enzymes // Anal. Chim. Acta. 1998. № 372. P. 173–185.  
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00349-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00349-3)
- Nolasco-Soria H. Improving and standardizing protocols for alkaline protease quantification in fish // Reviews in Aquaculture. 2021. V. 13. P. 43–65.  
<https://doi.org/10.1111/raq.12463>
- Pearson M.S., Ranjit N., Loukas A. Blunting the knife: development of vaccines targeting digestive proteases of blood-feeding helminth parasites // Biol. Chem. 2010. V. 391. P. 901–911.  
<https://doi.org/10.1515/BC.2010.074>
- Ranasinghe S.L., McManus D.P. Protease Inhibitors of Parasitic Flukes: Emerging Roles in Parasite Survival and Immune Defence // Trends in Parasitol. 2017. V. 33. № 5. P. 400–413.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.12.013>
- Rawlings N.D., Barrett A.J. Evolutionary families of peptidases // Biochem. J. 1993. V. 290. P. 205–218.  
<https://doi.org/10.1042/bj2900205>
- Smith D., Cwiklinski K., Jewhurst H., Tikhonova I.G., Dalton J.P. An atypical and functionally diverse family of Kunitz-type cysteine/serine proteinase

- inhibitors secreted by the helminth parasite *Fasciola hepatica* // Sci. Rep. 2020. № 10. P. 20657. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77687-7>
- Vainutis K.S., Voronova A.N., Mironovsky A.N., Zhigileva O.N., Zhokhov A.E. The Species Diversity Assessment of *Azygia* Looss, 1899 (Digenea: Azygiidae) from the Volga, Ob, and Artyomovka Rivers Basins (Russia), with Description of *A. sibirica* n. sp. // Diversity. 2023. V. 15. № 1. P. 119. <https://doi.org/10.3390/d15010119>
- Worthington Biochemical Corporation. Worthington enzyme manual: Enzymes. Enzyme Reagents. 1991. 346 p.

## Fluke worm *Azygia lucii* and pike *Esox lucius*: features of the relationship

T. V. Frolova<sup>#</sup>, A. S. Sokolova, G. I. Izvekova

*Papanin Institute for Biology of Inland Waters, Borok, Yaroslavl Region, 152742 Russia*  
<sup>#</sup>*e-mail: bianka28061981@gmail.com*

The effect of *Azygia lucii* fluke infection on the activity of proteolytic enzymes functioning in the stomach of the host pike and the ability of worms to suppress this activity was studied. The activity of a wide range of proteases was detected in the pike's stomach. In extracts of marita *A. lucii*, both pepsin-like activity and activity of alkaline proteases, a significant part of which are metal-dependent proteases, were determined. Even with a low intensity of invasion, trematodes cause an increase in the activity of pepsin-like proteases in the host's stomach. Worm extract suppresses the activity of commercial pepsin, but neither the incubation medium nor the trematode extract have a statistically significant inhibitory effect on the activity of pepsin-like proteases of the gastric mucosa of pike.

*Keywords:* fluke worm, parasite, host, pepsin-like and alkaline proteases, protease inhibitors