

Г. К. РЕЗНИК

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПАЗЫ В КИШЕЧНИКЕ НЕКОТОРЫХ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ НЕМАТОД И ТРЕМАТОД ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

(Представлено академиком К. И. Скрыбиным 13 IX 1971)

Липазы пищеварительного канала гельминтов привлекают внимание как в связи с выявлением у них самостоятельного пищеварения, так и определением источников и состава антигенов у инвазированных животных и человека.

Объектами настоящего исследования служили половозрелые *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium lanceatum*, *Ascaridia galli*, *Ascaris suum*. Биохимическими методами у аскариды и фасциолы обнаружены ^(1, 2) липолитическими ферменты, гидролизующие эфиры различных жирных кислот ($C_3 - C_{18}$), по клеточную локализацию их в тканях этих гельминтов установить не удалось ⁽³⁻⁵⁾. У аскаридий и дикроцелиев эти ферменты не исследовались.

В данной работе использовался гистохимический твин-метод Гомори. Реакцию проводили на криостатных срезах (20 μ) нефиксированных гельминтов. Последующая фиксация срезов (10 мин.) в холодном ацетоне или кальций-формоле по Бэкеру сильно снижала активность липазы. Субстратами служили сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и высших жирных кислот: пальмитиновой (твин 40) и стеариновой (твин 60) для алиэстеразы (АЭ), олеиновой (твины 80 и 85) для истинной липазы (ИЛ); в отличие от 80 твин 85 является триолеатом и более подходит для ИЛ ⁽⁶⁾. Для выявления локализации ИЛ и АЭ у гельминтов в прописи Гомори ⁽⁷⁾ пришлось изменить концентрацию твина и $CaCl_2$, расширить диапазон pH (табл. 1). Увеличение количества субстрата (твина) в 20 раз применялось в связи с указаниями ⁽⁸⁾, что при этом создаются физические условия для расщепления его липазой. Варьирование концентрацией $CaCl_2$ вызвано тем, что разные типы ИЛ активируются неодинаково ^(9, 10). Более широкий диапазон pH при выявлении ИЛ и АЭ использовали в связи с различием активной реакции среды в местах обитания этих гельминтов. Для контроля специфичности окраски применяли преинкубацию срезов в 5% растворе фенола (15 мин.), инактивацию в кипящей воде (3 мин.), инкубацию без субстрата.

Таблица 1

Различные варианты состава инкубационной среды для липаз

Состав среды	Пропись субстрата по Гомори (мл)	Модификация субстрата прописи Гомори (мл)		
		1	2	3
Твин *	1,0 (5%)	1,0 (10%)	10,0 (10%)	10,0 (10%)
2% $CaCl_2$	3,0	10,0	10,0	1,0
Дистил. вода	—	9,0	—	9,0
Буфер (трис 0,1 M)	45,0	30,0	30,0	30,0
pH	7,0—7,4	7,0—8,0	7,0—8,0	7,0—8,0

* В скобках указана концентрация раствора.

Проведение твин-реакции в указанных вариантах позволило обнаружить ИЛ и АЭ в кишечном эпителии обоих видов нематод; железы пищевода дали отрицательную реакцию. Осадки сульфида свинца во всех случаях имели одинаковую локализацию: равномерно заполняли цитоплазму кишечных клеток. Однако плотность их и, судя по ней, активность гидролиза, заметно зависели от вида нематоды и твина. Аскариды гидролизovali твин 60 интенсивнее, чем 85, аскаридии — почти одинаково (рис. 1 *a, б, г, д*, см вкл. к стр. 497); твин 40 расщеплялся обеими нематодами слабее, чем 60. Сравнение вариантов 1, 2 и 3 показало, что увеличение концентрации твинов положительно сказывается на активности ИЛ и АЭ обеих нематод, изменения концентрации CaCl_2 и pH сказываются по-разному. У аскариды повышение pH до 8 и увеличение ионов Ca^{2+} (вариант 2) активировало оба фермента, особенно ИЛ. У аскаридий лучшие результаты достигались в более нейтральной среде и при низком содержании CaCl_2 (вариант 3). Распределение ИЛ и АЭ вдоль эпителиального пласта кишечника у обеих нематод сходно: для ventрикулярного и среднего отделов характерна высокая активность, для преректального — низкая. Контрольная обработка срезов предотвращает развитие специфической окраски, неспецифически окрашиваются зерна пигмента (рис. 1 *в, е*). У фасциол и дикроцелиев ИЛ и АЭ были найдены в цитоплазме кишечного эпителия. У обеих трематод локализация их в клетках совпадает, но судя по плотности осадков сульфида свинца твины гидролизуются в следующем порядке: 60, 40, 85. У тех и других на активность ИЛ и АЭ положительно влияет увеличение количества субстрата (особенно твина 85), CaCl_2 и повышение pH до 8 (вариант 2). Контрольная обработка срезов полностью предотвращает окраску. Использование твина 80 для указанных видов нематод и трематод во всех вариантах дало отрицательный результат.

Таким образом, увеличение количества твинов в инкубационной среде Гомори, варьирование pH и концентрацией CaCl_2 позволило обнаружить активность и локализацию ИЛ и АЭ в кишечном эпителии двух видов нематод и трематод. Высокоактивные ИЛ и АЭ различаются у аскариды и аскаридий по активирующей концентрации CaCl_2 , оптимальной pH и относительной скорости гидролиза твинов 60 и 85. Наши результаты подтвердили биохимические данные (¹), что АЭ кишечника аскариды активнее ИЛ, и что для обеих оптимален pH 8. У фасциол и дикроцелиев на оба фермента одинаково положительно действуют повышение pH и концентрации CaCl_2 , сходна и относительная скорость гидролиза твинов, но активность ИЛ и АЭ у первых заметно выше, чем у вторых. Эти наблюдения можно рассматривать, как одно из доказательств способности к самостоятельному перевариванию пищи (в частности жира), сохранившейся в процессе филогенеза у изученных видов нематод и трематод, тем более, что у них найдена кишечная секреция (^{3, 11, 12}). С другой стороны, поступление липазы в просвет кишечника паразитов, несомненно, сопровождается попаданием ее в организм хозяина, где она, по аналогии с другими гельминтами (¹³), может играть роль функционального антигена.

Всесоюзный институт гельминтологии
им. К. И. Скрабина
Москва

Поступило
13 IX 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ W. Rogers, J. Helminthol., 19, 1—2 (1941). ² E. Pantelouris, Res. in veter. Sci., 8, 2 (1941). ³ D. Lee, The Physiology of Nematodes, Edinburgh — London, 1965. ⁴ D. Halton, J. Parasitol., 53, 6 (1967). ⁵ J. Smyth, The Physiology of Trematodes, Edinburgh — London, 1966. ⁶ Э. Пирс, Гистохимия, М., 1962. ⁷ J. George, P. Ambadkar, J. Histochem. and Cytochem., 11, 3 (1963). ⁸ И. Шнайдем, И. Яцен, Арх. анат., гистол. и эмбриол., 52, 1 (1967). ⁹ Г. Новицкая, Усп. совр. биол., 50, 1 (1960). ¹⁰ Ф. Лейтес, Усп. совр. биол., 59, 2 (1965). ¹¹ Г. Резник, Тр. Всесоюз. инст. гельминтол., 10 (1963). ¹² Г. Резник, ДАН, 182, № 3 (1968). ¹³ R. Thorson, Am. J. Hyg., 58, 1 (1953).