

ФИЗИОЛОГИЯ

С. Г. ГРЕБЕЛЬСКИЙ

**О ФИЗИОЛОГИИ ПИТАНИЯ ЛИЧИНОК КОЖНОГО ОВОДА
(*OEDEMAGENA TARANDI* L.) СЕВЕРНОГО ОЛЕНЯ**

(Представлено академиком Л. А. Орбели 20 IV 1948)

Все имеющиеся в литературе далеко неполные данные об *Oedemagena tarandi* посвящены изучению биологии этого насекомого. До сих пор не было предпринято попытки изучения его физиологических особенностей.

Изучение процессов питания эндопаразитической личинки овода важно для понимания патогенеза „оводной болезни“. С другой стороны, в процессе индивидуального развития, вместе с переходом от паразитического к свободному образу жизни резко изменяется и характер питания. В то время как личинка является тканевым паразитом со специфическим характером питания, взрослое свободно движущееся насекомое переходит к другой крайности — к полной редукции питания, к афагии.

Исследование проведено нами на личинках разных возрастов (включая свободно движущуюся стадию) и куколках в начале и в конце куколочной жизни. Ферменты исследовались отдельно в слюнных железах, в передней, средней и задней кишке.

Материал для исследования ферментов готовился следующим образом: та или иная часть кишечника растиралась в присутствии стеклянного порошка, затем смешивалась с водой, физиологическим раствором или (чаще) глицерином в отношении 1:4 (по весу). Смесь после добавления нескольких капель толуола помещалась на холод, и через сутки вытяжка употреблялась для определения ферментов. Средняя кишка в отдельных опытах бралась вместе с содержимым, в других — тщательно отмывалась физиологическим раствором и дистиллированной водой. Вытяжка каждого отдела кишечника испытывалась на присутствие протеаз, липазы, амилазы и химозина. Все опыты велись при температуре 37—40°С в присутствии в качестве антисептика толуола. Буферными растворами служили фосфатные смеси Серенсена и в отдельных случаях цитратный буфер. Контроль ставился по такой же схеме, как опыт, но с заменой ферментной вытяжки равным количеством физиологического раствора или глицерина.

Протеолитические ферменты, работающие в слабощелочной среде, определялись по методу Вильштеттера в микромодификации Грассмана. Субстратом служил 3% раствор стерильной желатины. Для суждения о наличии фермента типа пепсина, работающего в условиях очень низкого значения pH, мы поставили серию опытов с окрашенным фибрином при pH=2,5. Определение химозина велось методом, который применял Симмонс⁽³⁾. Липаза определялась по нарастанию кислотности, вызванной ферментацией жира. Жир вводился в опыт в виде 10% водной эмульсии сливок, предварительно простерилизо-

ванной на кипящей водяной бане. В одних вариантах мы полностью следовали методике, примененной Рой (2). В других вариантах (параллельные серии) мы модифицировали эту методику, изменив соотношения компонентов смеси (0,1 мл вытяжки и 3 мл эмульсии сливок) и вводя в качестве активатора 1 каплю 3% альбумина и 1 каплю 2% CaCl_2 . Определение амилазы проводилось по принципу Вольгемута. Субстратом служил 1% раствор крахмала (растворимого) и в части опытов раствор гликогена той же концентрации. В опытах с амилазой употреблялись главным образом водные вытяжки, так как известно, что глицерин подавляет активность этого фермента.

Полученные результаты сведены в табл. 1, из которой видно, что пищеварение в основном осуществляется средней кишкой, поскольку в остальных отделах кишечника ферментов не найдено. Наличие в средней кишке собственной липазы более чем сомнительно. В то время как экстракт кишки с содержимым всегда вызывает сильное пожелтение сливок обычно через 5—6 час. после начала опыта, а через 16—17 час. окраска становится лимонно-желтой, экстракт кишки без содержимого, за исключением нескольких опытов, не вызывал никакого изменения цвета сливок. Слабо положительный результат нескольких опытов следует отнести за счет недостаточно полного удаления содержимого кишки, или, возможно, за счет работы внутриклеточной липазы. В содержимое кишечника попадает липаза слюнных желез, которые вырабатывают только этот фермент. Собственная амилаза средней кишки, так же как и амилаза кишки с содержимым, отличается очень слабой активностью. В большинстве случаев через 2—3 суток обнаруживается только декстринизация, и лишь в редких случаях на 3—4-й день с помощью люголевского раствора не удается обнаружить ни крахмала, ни декстринов. Предполагая, что вялое течение рассматриваемого процесса обусловлено недостаточно специфичным субстратом, мы поставили несколько опытов с гликогеном. В этом случае процесс шел несколько быстрее, и иногда уже через несколько часов после начала опыта разница с контролем становилась достаточно резкой, а через 2—3 дня во всех случаях гликогена в смеси не оставалось. Личинка *Oedemagena tarandi* может встречаться только с гликогеном, попадание которого в кишечник возможно с кровью или тканевыми жидкостями хозяина, и никогда не питается крахмалом.

Понятно поэтому, что разложение растворимого крахмала требует более длительного срока взаимодействия фермента с субстратом. Однако и в случае гидролиза гликогена обращает на себя внимание медленное течение процесса ферментации.

Таблица 1

Пищеварительные ферменты личинки

Oedemagena tarandi L.

Название органа	Фермент				
	Ами-лаза	Липаза	Химо-зин	Протеаза	
				типа трип-тазы	типа пеп-тидазы
Слюнные железы . .	—	+	—	—	—
Средняя кишка с со- держимым	+	+	+	+	—
Средняя кишка без содержимого . . .	+	—	—	+	—
Передняя кишка . .	—	—	—	—	—
Задняя кишка без со- держимого	—	—	—	—	—

Определение химозина производилось только в кишке с содержанием, и во всех опытах он был обнаружен обычно в пределах первых 4 час. от начала опыта.

Таблица 2

Протеолитическое действие экстрактов средней кишки личинок *Oedemagena tarandi* L.

(концентрация 1:4; pH = 7,5; t° = 37–40°)

М а т е р и а л	Время в часах	Количество 0,01 N KOH, пошедшего на титрование в опыте, в см ³	Наращение кислотности 0,01 N KOH в см ³	Количество 0,01 N KOH, пошедшего на титрование в контроле, в см ³
Кишка без содержимого	0	1,07	—	0,87
	24	2,50	1,43	0,82
	48	3,31	2,24	0,85
	72	3,50	2,43	0,72
Кишка с содержимым	0	1,42	—	0,76
	24	3,58	2,16	0,79
	48	3,70	2,28	0,87
	72	3,84	2,24	0,81

Для иллюстрации активности протеазы средней кишки личинок выше приводятся протоколы опытов (табл. 2). Из приведенного материала видно, что активность протеазы кишки, тщательно отмытой от содержимого, незначительно уступает таковой в опытах с кишкой, не освобожденной от содержимого. Несомненно, что обнаруженная протеаза является собственным ферментом средней кишки.

Таблица 3

Влияние реакции среды на активность протеазы кишечника личинок *Oedemagena tarandi* L.

Значение pH	Наращение кислотности, выраженное в см ³ 0,01 N KOH (через разное время)		
	24 часа	48 час.	72 часа
6,5	0,70	0,87	1,02
7,5	0,61	1,08	1,47
7,8	0,53	0,77	1,19

Оптимальное значение реакции среды для работы кишечной протеазы (табл. 3) лежит в зоне pH=7,5. Вместе с тем при изменении pH до 6,5 активность протеолиза снижается незначительно. Видимо, инактивация протеазы происходит в более кислой среде.

Интересно отметить, что Симмонс (3), исследовавший ферменты пищеварительного тракта личинки *Hypoderma lineatum* de Vill., считает, что слюнные железы этих личинок не секретируют никаких ферментов. В средней кишке этим автором найдены собственная липаза, гликогеназа и протеазы. Возможно, что секреция липазы средней кишкой, а не слюнными железами, является особенностью личинок *Hypoderma lineatum* de Vill. Однако вероятно также, что эти результаты зависят от техники исследования. Как показал наш опыт, при работе с кишкой требуется очень тщательное и быстрое отмывание ее от содержимого (которое мы производили с помощью шприца, вводя тонкую иглу в просвет кишки). Промывание слюнных желез перед опытом (от гемолимфы) следует производить очень быстро. Важно также брать для экстракции достаточное количество материала. Ферменты, обнаруженные нами в кишечном тракте личинок *Oedemagena*

tarandi, являются собственными ферментами. Попадание в кишечный тракт личинки ферментов, вырабатываемых тканями оленя, возможно, однако значение их для пищеварения личинки вряд ли велико: протеаза в тканях капсулы, окружающей личинку, нами не обнаружена, в отношении липазы результат не ясен (если она и есть, то активность ее незначительна и несравнима с активностью липазы личинки). Участие бактерий в процессе переваривания пищи, как это имеет место у других насекомых, здесь исключается, так как, и по нашим данным и по данным С. С. Касаткевич и В. К. Карчевской (1), содержимое кишечника во время паразитирования стерильно. Состав ферментов, секретлируемых пищеварительной системой паразитирующей личинки *Oedemagena tarandi*, указывает на приуроченность ее питания в основном к белковой пище. Действительно, содержимое кишечника личинок старших возрастов большей частью темнокрасного цвета, напоминающего кровь. Просмотр мазков содержимого кишечника в этих случаях показал присутствие эритроцитов, лимфоцитов и других клеточных элементов крови. При выдавливании личинок старших возрастов очень часто в капсулах заметно истечение крови. Набор пищеварительных ферментов личинки создает возможность питания кровью, и, согласно вышеприведенным данным, это имеет место, хотя кровь, видимо, не единственный используемый пищевой субстрат.

Секретция в пищеварительной системе личинок *Oedemagena tarandi* липазы и протеазы дает повод полагать, что образование и поддержание фистулы в коже оленя идет главным образом ферментативным путем. Выделение ферментов возможно с экскрементами. У спокойно лежащих личинок постоянно можно наблюдать выделение капель жидких экскрементов, появление которых часто следует почти что одно за другим, но часть капель втягивается обратно через анальное отверстие. Способствовать ферментативному процессу при образовании фистулы может также травмирование и раздражение кожи оленя шипами постериального шиповатого поля, сильно развитого у личинок ранних возрастов. Ферменты, выделяемые личинкой, играют, повидимому, важную роль также в противодействии пролиферативным процессам в окружающей личинку ткани хозяина, что способствует сохранению капсулы.

Поскольку взрослое насекомое не питается, нам представлялось интересным решить: 1) редуцируется ли секреторная функция кишечника, или остается в качестве физиологического рудимента, и 2) если секреторная функция кишечника редуцируется, то на какой стадии метаморфоза это происходит. Анализ ферментов кишечного тракта у личинок разных возрастов не дает возможности говорить о каких-либо возрастных изменениях их активности: возрастные колебания в среднем не превышают отклонений опытов. Кишечник свободноживущей личинки содержит все те ферменты, которые обнаруживаются у паразитирующих личинок. Кишечник куколки исследовался в самом начале куколочной жизни и перед окрылением. На этих этапах во всех опытах получен отрицательный результат, указывающий, что кишечник *Oedemagena tarandi* L. на этой стадии развития не секретировать ферментов. Прекращает ли кишечник функционировать на стадии куколки с тем, чтобы на стадии имаго вновь начать секретировать ферменты, или эта потеря функции необратима, пока не ясно.

Кольская научно-исследовательская база
Академии Наук СССР

Поступило
13 IV 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ С. С. Касаткевич и В. К. Карчевская, Бюлл. зоопарков и зоосадов, 6—7, 37 (1934). ² D. W. Roj, Parasitology, 29, 150 (1937). ³ S. W. Simmons, Ann. Entom. Soc. America, 32, 3 (1939).