

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр
"Карельский научный центр Российской академии наук"

На правах рукописи

КОЧНЕВА

Альбина Александровна

**ПРОТЕОМЫ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЦЕСТОД НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ
ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА**

Специальность 1.5.17 – Паразитология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Смирнов Лев Павлович

Петрозаводск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Молекулярно-генетические особенности метаболизма цестод.....	12
1.2 Исследования белкового состава цестод на различных стадиях жизненного цикла...	17
1.3 Изучение белкового состава секреторно-экскреторных продуктов цестод	22
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	26
2.1. Объекты исследования.....	26
2.2 Секвенирование транскриптома <i>T. nodulosus</i>	26
2.3 Анализ белкового состава различных отделов тела плероцеркоидов и взрослых особей <i>T. nodulosus</i> и <i>T. crassus</i>	28
2.4 Анализ белкового состава плероцеркоидов <i>T. nodulosus</i> из различных видов вторых промежуточных хозяев	32
2.5 Изучение вариабельности состава протеома <i>S. solidus</i> при переходе от стадии плероцеркоида к половозрелому гельминту.....	34
2.6 Изучение паразито-хозяйинных отношений <i>S. solidus</i> и трехиглой колюшки <i>G. aculeatus</i> : анализ белкового состава смывов с покровов тела плероцеркоидов и целомической полости рыб	38
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	42
3.1 Изучение белкового состава цестод <i>Triaenophorus</i> spp.....	42
3.1.1. Первые данные о составе транскриптома <i>T. nodulosus</i>	42
3.1.2. Сравнительный анализ белкового состава различных отделов тела плероцеркоидов и взрослых особей <i>T. nodulosus</i> и <i>T. crassus</i>	44
3.1.3 Изучение белкового состава плероцеркоидов <i>T. nodulosus</i> из различных видов вторых промежуточных хозяев.....	48
3.2. Реорганизация протеома цестоды <i>Schistocephalus solidus</i> при переходе от стадии плероцеркоида к половозрелому гельминту.....	53
3.3 Изучение паразито-хозяйинных отношений плероцеркоидов <i>S. solidus</i> и трехиглой колюшки <i>G. aculeatus</i> : анализ белкового состава смывов с покровов тела паразита и целомической полости хозяина	65

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	72
ВЫВОДЫ	74
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	75
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	77
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	101
ПРИЛОЖЕНИЕ	104
Таблица 3 - Идентифицированные масс-спектрометрическим методом белки различных отделов тела цестод <i>T. nodulosus</i> и <i>T. crassus</i>	104
Таблица 5 - Идентифицированные белки колюшки <i>G. aculeatus</i> , содержание которых достоверно различалось в смывах из полости тела зараженных и незараженных рыб.	107
Таблица 6 - Белки <i>S. solidus</i> , обнаруженные в смывах зараженных особей трехиглой колюшки <i>G. aculeatus</i> и в смывах с покровов тела инвазионных плероцеркоидов паразита.	110

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Ленточные черви — это высокоспециализированная группа организмов, которая представлена облигатными эндопаразитами со сложным жизненным циклом. Хозяевами цестод являются живые организмы из различных систематических групп, значительно отличающихся друг от друга по экологическим, морфофизиологическим и биохимическим признакам, что определяет условия среды 1-го и 2-го порядка паразитов [131, 176]. Ленточные черви обладают определенной гостальной специфичностью, которая выражается в приуроченности к узкому или широкому кругу хозяев, что отражает их приспособленность к среде 1-го порядка [23]. В основе такой экологической пластичности цестод лежит их способность при переходе на новую стадию онтогенетического развития запускать адаптивные биохимические, физиологические и морфологические механизмы [13]. В строении ленточных червей можно отметить два основных признака: редукция пищеварительной системы, функции которой у них выполняет тегумент, и усовершенствование половой системы в сторону повышения ее эффективности за счет метамерного строения и процесса стробилиации [12]. В основе вышеперечисленных адаптаций цестод к паразитическому образу жизни лежит синтез набора специфических белков, закодированных их в геноме. Изучением белкового состава организма занимается наука протеомика (англ. proteomics), а совокупность всех белков организма, носит название «протеом». Протеомика паразитических червей в настоящее время стоит фактически в начале своего становления как самостоятельного раздела молекулярной биологии [19]. К ее задачам относятся идентификация и количественное определение белков паразитов на разных стадиях онтогенеза при реализации жизненного цикла и при смене хозяев, получение спектров белков гельминтов и их картирование, выявление различий в протеомах паразитов различных видов, а также поиск белков-мишеней наиболее пригодных для создания эффективных антигельминтных препаратов. Молекулярные механизмы реализации адаптационного потенциала гельминтов, направленные на поддержание эффективного процесса паразитирования, на данный момент слабо изучены. Значимость протеомных исследований паразитических червей определяется тем, что белки являются конечным звеном в реализации генетической информации, определяющей фенотип организма в его текущем состоянии на момент отбора проб. Таким образом, представителей класса Ленточные черви можно считать перспективными объектами для исследований биохимических особенностей организмов, ведущих паразитический образ жизни.

Степень разработанности темы исследования. Первые работы по изучению биохимических особенностей паразитических плоских червей появились в 40-50е годы 20 века. На начальных этапах исследования были посвящены описанию аминокислотного состава белков гельминтов и изучению механизмов потребления гельминтами различных питательных веществ и элементов [41, 45, 70, 111, 113, 149, 150, 151, 152, 155, 157, 158, 159, 160, 179, 180, 187, 188]. В дальнейшем круг направлений исследования жизнедеятельности паразитических червей расширился. Проводилось изучение функционирования и ультраструктуры нервной, репродуктивной и мышечной систем паразитических плоских червей [26, 33, 34, 220, 221], изучение различных аспектов взаимоотношений в системе «паразит-хозяин», таких как выявление влияния заражения на активность пищеварительных ферментов хозяина [15, 16, 17, 117, 118, 119], иммунологические и физиологические взаимосвязи между паразитом и его хозяином [50, 53, 57, 135, 136, 178, 194, 217, 234, 249]. В последнее десятилетие в качестве методов изучения особенностей метаболизма паразитических червей активно применяются протеомные подходы [66, 104, 105, 162, 163].

В лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН, где выполнялось диссертационное исследование, проводились работы по изучению биохимии цестод, которые посвящены установлению роли углеводов, липидов, аминокислот, лизосомальных и других ферментов у гельминтов, выявлению биохимических особенностей паразито-хозяинных отношений [6, 7, 28, 29, 30, 31, 32, 236].

Цель настоящей работы заключалась в изучении качественного и количественного состава белков цестод *Triaenophorus nodulosus*, *T. crassus* и *Schistocephalus solidus* в зависимости от стадии онтогенеза и гостальной специфичности паразитов.

Для достижения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. провести сравнительный анализ состава белков в различных отделах тела плероцеркоидов и взрослых особей *T. nodulosus* и *T. crassus*;
2. охарактеризовать протеомы плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных видов вторых промежуточных хозяев (окунь *Perca fluviatilis* L., ерш *Gymnocephalus cernuus* L. и налимом *Lota lota* L.);
3. провести сравнительный анализ протеомов инвазионных плероцеркоидов и взрослых червей *S. solidus*;
4. описать состав белков в зоне физического контакта паразита *S. solidus* (поверхность тела) и его хозяина - трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. (целомическая полость).

Научная новизна. Изучение молекулярных основ жизнедеятельности организмов позволяет объяснить механизмы, лежащие в основе явлений, наблюдаемых на организменном и

популяционном уровнях. Описание состава белков (протеома), как важнейшей компоненты метаболизма паразитических членистоногих позволит раскрыть такие вопросы, как эволюционная история представителей типа Плоские черви (наличие или отсутствие уникальных молекулярных механизмов таксонов), приспособление к паразитическому образу жизни и реализация отношений в системе «паразит-хозяин» (механизмы избирательности паразитов к отдельным таксонам хозяев, механизмы освоения гельминтами новых видов хозяев, защита паразитов от иммунного ответа хозяина, направленная регуляция метаболизма хозяина), взаимоотношения паразита со средой второго порядка при обитании в стабильной среде первого порядка и другие вопросы.

В данной работе впервые описаны белковые профили гельминтов *Triaenophorus* spp. и *Schistocephalus solidus* (Müller, 1776). Была изучена вариабельность протеома цестод *S. solidus*, *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) и *T. crassus* (Forel, 1868) в зависимости от фазы жизненного цикла паразита и вида заселяемого хозяина (гостальная специфичность), также описано распределение белков в различных частях тела червей *Triaenophorus* spp. Впервые проведена сборка транскриптома *T. nodulosus* и на основе полученных данных составлена база белковых последовательностей данного вида гельминта.

Объект и предмет исследования. Объектами исследования в данной работе являются представители класса Ленточные черви – *S. solidus*, *T. nodulosus* и *T. crassus*. В качестве предмета исследования выступает вариабельность белкового состава *S. solidus*, *T. nodulosus* и *T. crassus* в зависимости от фазы онтогенеза и гостальной специфичности гельминтов, а также особенности взаимодействия паразита и хозяина на уровне белков (с использованием модельной системы «трехиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* L. – цестода *S. solidus*»).

Методология и методы исследования. Для решения поставленных задач были применены паразитологические и биохимические методы. Видовое определение цестод *Triaenophorus* spp. и *Schistocephalus* sp. проводилось в соответствии с общепринятыми методиками [10, 23, 133]. В качестве методов исследования белкового состава гельминтов были выбраны классические методы и подходы протеомики, такие как одно- и двумерный электрофорез, 2D-DIGE (2-dimensional Difference Gel Electrophoresis) и масс-спектрометрический анализ MALDI-TOF-MS/MS (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight-Tandem Mass Spectrometry) и LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry). В связи с тем, что в базах данных белковых последовательностей отсутствовали аннотации для паразитических червей рода *Triaenophorus*, была проведена сборка транскриптома *T. nodulosus* на секвенаторе нового поколения HiSeq 400 Sequencing System (Illumina). Обработка и статистический анализ полученных данных проведены с использованием соответствующих общепринятых статистических методов и алгоритмов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы состоит в получении новых знаний и представлений о молекулярных и биохимических основах жизнедеятельности паразитических организмов, механизмах компенсаторных реакций, лежащих в основе регуляции и поддержания гомеостаза системы «паразит-хозяин» на организменном и популяционном уровнях организации.

Результаты работы, представляющие подробное профилирование белков гельминтов, позволили получить уникальные данные о биохимических адаптациях цестод *T. nodulosus*, *T. crassus* и *S. solidus* к паразитическому образу жизни, в том числе эволюционно закрепленных, раскрыть физиолого-биохимические механизмы их циклов развития. Полученные данные могут быть применены для выявления белков-мишеней при разработке антигельминтных препаратов, для осуществления контроля за эпизоотическим состоянием рыб естественных водоемов и рыбоводных хозяйств, а также могут быть использованы в лекционных курсах по паразитологии, ихтиопатологии, экологической физиологии и биохимии животных.

На защиту выносятся следующие положения:

1. Протеомы различных отделов тела цестод *T. nodulosus* и *T. crassus* (сколекс, незрелые и зрелые проглоттиды) определяют их функциональную специфичность и характеризуются качественной и количественной вариабельностью по содержанию некоторых структурных белков и ферментов углеводного обмена.
2. Вариабельность белкового состава плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных видов вторых промежуточных хозяев определяется биохимическим соответствием паразита и хозяина (рыбы), характеризующимся дифференциальной экспрессией тубулинов, G-белка и триозофосфатизомеразы червей.
3. Переход *S. solidus* от стадии инвазионной личинки к взрослому паразиту сопровождается изменениями протеома, направленными на интенсификацию процессов энергообеспечения и белкового анаболизма.
4. Заражение трехиглой колюшки *G. aculeatus* инвазионными плероцеркоидами *S. solidus* сопровождается повышенной секрецией белков в системе «паразит-хозяин», участвующих в некоторых метаболических процессах, в том числе, в регуляции иммунных и воспалительных реакций.

Степень достоверности результатов. Достоверность результатов исследования обеспечена использованием достаточного количества образцов для биологических и технических повторов, применением современных общепринятых статистических методов и алгоритмов обработки масс-спектрометрических данных. Все полученные результаты исследования прошли независимое рецензирование при их опубликовании в российских и зарубежных научных изданиях.

Апробация результатов исследования. Результаты проведенных исследования были представлены и обсуждены на 8 международных и 1 всероссийской конференциях: Объединенный научный форум Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова», VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (18-22 сентября 2017 г., Москва, ИБХ РАН); 11-ая Международная конференция по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (20–25 августа 2018 г., Новосибирск, Россия); Зимняя школа по биоинформатике EuVIC Winter School on proteomics bioinformatics (10-13 января 2017, Зиммеринг, Австрия); Конференция "Young biologists science Week-2017" (20-25 ноября 2017 г., Петрозаводск, Россия); Школа по практической протеомике «The 1st EuPA School on Practical Proteomics» (8-12 октября 2017 г., Сплит, Хорватия), XII Съезд Гидробиологического общества при РАН (2019 г., Петрозаводск, Россия); VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы (2019 г., Санкт-Петербург); Вторая Всероссийская конференция с международным участием «Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические механизмы адаптаций гидробионтов» (24–28 октября 2020 г., Борок); 72-я Всероссийская (с международным участием) научная конференция обучающихся и молодых ученых - диплом за лучший доклад на секции «Зоология» (6 апреля - 26 апреля 2020 г., Петрозаводск).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 14 научных работ, в том числе 9 статей, 4 из которых в изданиях из перечня научных журналов, рецензируемых ВАК при Минобрнауки России, и 5 в международных изданиях, индексируемых в базах Scopus и Web of Science (WoS), а также 5 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях.

Публикации в изданиях из перечня рецензируемых научных журналов ВАК:

1. Смирнов, Л.П. Глутатион S-трансферазы у гельминтов / Л.П.Смирнов, Е.В.Борвинская, **А.А.Кочнева**, И.В.Суховская // Труды Карельского научного центра РАН. - 2015. - Т. 11. - С.3–14. DOI: 10.17076/eb213.

2. **Кочнева, А.А.** Особенности ферментативной активности глутатион S-трансферазы и уровень восстановленного глутатиона у щуки *Esox lucius* L. и ее облигатного паразита цестоды *Triaenophorus nodulosus* / **А.А.Кочнева**, Е.В.Борвинская, И.В.Суховская, Е.П.Иешко, Л.П.Смирнов // Труды Карельского научного центра РАН. - 2016. - Т. 11. - С.48–56. DOI: 10.17076/eb429.

3. **Кочнева, А.А.** Протеомные исследования особенностей жизнедеятельности паразитических червей (обзор) / **А.А.Кочнева**, Л.П.Смирнов, Е.В.Борвинская, Д.С.Бедулина, И.В.Суховская // Паразитология. - 2018. - Т. 52. - № 3. - С.177-204.

4. **Кочнева, А.А.** Сравнение профиля белков плероцеркоидов цестоды *Triaenophorus nodulosus* из различных промежуточных хозяев / **А.А.Кочнева**, Е.В.Борвинская, Д.С.Бедулина, И.В.Суховская // Труды Карельского научного центра РАН. - 2018. - Т. 12. - № 1. - С.12. DOI: 10.17076/eb899.

Публикации в международных изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и WoS:

1. Borvinskaya, E.V. The effect of *Triaenophorus nodulosus* (cestoda: Bothriocephalidea) infection on some biochemical parameters of the liver of *Perca fluviatilis* / E.V.Borvinskaya, I.V.Sukhovskaya, L.P.Smirnov, **А.А.Кочнева**, A.N.Parshukov, M.Y.Krupnova, E.A.Buoy, R.U.Vysotskaya, M.V.Churova // Journal of Parasitic Diseases. - 2019. - Vol. 43. - N 4. - P. 566-574. DOI: 10.1007/s12639-019-01128-0.

2. **Kochneva, A.** The first transcriptomic resource for the flatworm *Triaenophorus nodulosus* (cestoda: bothriocephalidea), a common parasite of holarctic freshwater fish / **А.Кочнева**, E.Borvinskaya, P.Drozdova // Marine Genomics. - 2019. - Vol. 51. - P.100702. DOI: 10.1016/j.margen.2019.100702.

3. **Kochneva, A.** Zone of interaction between the parasite and the host: protein profile of the body cavity fluid of *Gasterosteus aculeatus* L. infected with the cestode *Schistocephalus solidus* (Muller, 1776) / **А.Кочнева**, E.Borvinskaya, L. Smirnov // Acta Parasit. - 2021. - Vol. 66. - P.569–583. DOI: 10.1007/s11686-020-00318-8.

4. Borvinskaya, E.V. Temperature-induced reorganisation of *Schistocephalus solidus* (Cestoda) proteome during the transition to the warm-blooded host / E.V.Borvinskaya, **А.А.Кочнева**, P.B.Drozdova, O.V.Balan, V.G.Zgoda // Biol Open. - 2021. - Vol. 10. - N 11. - P.bio058719. DOI: 10.1242/bio.058719.

5. Borvinskaya, E. Comparative analysis of proteins of functionally different body parts of the fish parasites *Triaenophorus nodulosus* and *Triaenophorus crassus* / E.Borvinskaya, **А.Кочнева**, D.Bedulina, I.Sukhovskaya, L.Smirnov, I.Babkina // Acta Parasit. - 2021. - Vol. 66. - P.1137–1150. DOI: 10.1007/s11686-021-00384-6.

Тезисы докладов конференций:

1. **Кочнева А. А.** Изучение белков цестоды *Triaenophorus nodulosus* на разных этапах жизненного цикла гельминта / **А.А.Кочнева**, Е.В.Борвинская, Д.С.Бедулина, Б.К.Бадуев, Г.А.Федорова // ActaNaturae, спецвыпуск: Научные труды объединенного научного форума Международной научной конференции по биоорганической химии "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова", VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва: ИБХ РАН, 18-22 сентября 2017 года. - М: «Перо», 2017. - С.33. режим доступа: <https://yadi.sk/i/m4KO1xAf3Ngx3q>

2. **Kochneva, A.** The study of protein composition of *Triaenophorus* sp. at different stages of the life cycle and in different body segments / A.Kochneva, E.Borvinskaya, D.Bedulina // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (BGRS\SB-2018) : The Eleventh International Conference, Novosibirsk, 20–25 августа 2018 года. – Novosibirsk: ICG SB RAS, 2018. – P. 108. – DOI 10.18699/BGRSSB-2018-081.

3. **Кочнева, А. А.** Влияние кратковременной инкубации при 40 °С на спектр белков плероцеркоидов *Schistocephalus solidus* / А.А.Кочнева, Е.В.Борвинская, Д.С.Бедулина, П.Б. Дроздова // XII Съезд Гидробиологического общества при РАН : тезисы докладов, Петрозаводск, 16–20 сентября 2019 года. – Петрозаводск: Карельский научный центр Российской академии наук, 2019. – С. 259-261.

4. **Кочнева, А. А.** Изменения белкового профиля плероцеркоидов *Schistocephalus solidus* после кратковременной инкубации при 40° С / А.А.Кочнева, Е.В.Борвинская, Д.С.Бедулина // VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы : Сборник тезисов Международного Конгресса, Санкт-Петербург, 18–22 июня 2019 года. – Санкт-Петербург: ООО "Издательство ВВМ", 2019. – С. 716.

5. **Кочнева, А. А.** Изменчивость протеома (в т.ч. предсказанного секретома) плероцеркоидов *Schistocephalus solidus* в условиях экспериментального моделирования изменений температурного режима паразита при смене хозяина / А.А.Кочнева // Научно-исследовательская работа обучающихся и молодых ученых : материалы 72-й Всероссийской (с международным участием) научной конференции обучающихся и молодых ученых, Петрозаводск, 09–29 апреля 2020 года / Петрозаводский государственный университет. – Петрозаводск: Петрозаводский государственный университет, 2020. – С. 45-48.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 112 страницах машинописного текста, состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждения), заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений, списка иллюстративного материала и приложения. Список литературы включает 252 источника, из них 35 отечественные. Диссертация также содержит 11 рисунков и 6 таблиц.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертационное исследование соответствует специальности 1.5.17 «Паразитология» по следующим пунктам паспорта специальности:

1. Всестороннее изучение явлений и сущности паразитизма, закономерностей жизни паразитов и взаимодействия их с живой средой хозяев.

2. Всестороннее изучение самих паразитов: морфологии, биохимии, генетики, физиологии, систематики.

3. Изучение взаимоотношений в системе: хозяин – паразит (иммунология, патология, иммуногенетика хозяев).

Личный вклад автора. Автор принимал личное участие в экспедиционных работах по сбору материала для исследований. Постановка задач и разработка плана исследований, поиск и обобщение литературных сведений по теме исследования, пробоподготовка, проведение экспериментальных исследований, анализ, обсуждение, интерпретация и обобщение полученных результатов, формулировка выводов выполнены автором лично.

Благодарности. Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю Заслуженному деятелю науки Республики Карелия, ведущему научному сотруднику лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН, доктору биологических наук **Смирнову Льву Павловичу**. Искренне признательна ведущему научному сотруднику лаборатории «Проблемы адаптации биосистем» НИИ биологии ИГУ, кандидату биологических наук **Борвинской Екатерине Витальевне** и старшему научному сотруднику лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН, кандидату биологических наук **Суховской Ирине Викторовне** за помощь в реализации экспериментальных и экспедиционных работ. Выражаю благодарность **всем сотрудникам** лаборатории экологической биохимии Института биологии КарНЦ РАН за постоянную помощь и поддержку. Благодарю за помощь в работе и ценные рекомендации сотрудников кафедры Ихтиологии и Гидробиологии биологического факультета СпбГУ (Лайус Д.Л, Иванов М.В., Иванова Т.С.). Исследования были проведены в рамках государственного задания КарНЦ РАН № 0218-2019-0076 и № 0221-2014-0033, а также были поддержаны грантами РФФИ № 17-04-01700 и № 19-34-90095.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Молекулярно-генетические особенности метаболизма цестод

Класс Ленточные черви (Cestoda) представлен высокоспециализированной группой облигатных эндопаразитов. Жизненный цикл цестод является сложным (3-4 фазы), и представляет собой чередование морфологически и физиологически различных форм паразита, приспособленных к выживанию и развитию в хозяевах из различных систематических групп. [131, 172, 176]. Ткани хозяина, окружающие гельминтов, представляют собой среду первого порядка и оказывают прямое влияние на паразита, стимулируя формирование адаптации на каждой стадии развития. Среда второго порядка, которая определяется биотическими и абиотическими условиями обитания хозяина, также оказывает влияние на взаимосвязи в системе «паразит-хозяин» [138]. В эволюционном процессе цестод можно выделить два основных направления: усложнение жизненного цикла путем использования пищевых связей между различными группами животных-хозяев и усовершенствование половой системы в сторону повышения ее эффективности [13]. В результате ленточные черви приобрели ряд морфологических, физиологических и биохимических приспособлений, характерных только для данного класса гельминтов. Отличительной чертой строения цестод является отсутствие пищеварительной системы. Функцию переваривания и всасывания пищи у них выполняет наружный покровный эпителиальный слой - тегумент, который является морфологическим аналогом эпителия кишечника высших животных [35], и он по образному выражению М.Н.Дубининой представляет собой «вывернутый наизнанку кишечник» [13]. Помимо морфофизиологических особенностей строения тегумента в осуществлении трофической функции участие принимают различные ферменты (фосфорилазы, эстеразы, протеиназы, пептидазы, АТФ-азы и другие) [35].

В классе Ленточные черви выделяют два подкласса - Eucestoda и Cestodaria, первый из которых включает в себя большинство видов. К одной из важных особенностей строения червей подкласса Eucestoda по сравнению с паразитами других таксономических групп Plathelminthes относится явление стробилиации [13, 131, 172]. Стробилиация представляет собой процесс последовательного образования новых проглоттид в районе шейного отдела стробилы, который начинается со стадии плероцеркоида и сохраняется в течение всей жизни паразита [13]. Метамерное строение эуцестод, заключающееся в формировании набора репродуктивных органов в каждой проглоттиде, в комбинации с явлением стробилиации обеспечивают высокий

уровень плодовитости гельминтов за счет возможности, как перекрестного оплодотворения, так и самооплодотворения [77, 172].

Морфофизиологические адаптации цестод к паразитическому образу жизни обусловлены специфическими особенностями их биохимической организации, которые затрагивают все метаболические пути. Для ленточных червей основным источником энергии являются углеводы, катаболизм которых осуществляется аэробным или анаэробным путями [223]. Процеркоиды *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) получают глюкозу из тканевой жидкости рачка, плероцеркоиды, паразитирующие в печени рыб, поглощают глюкозу, полученную из гликогена, а взрослые особи, обитающие в кишечнике рыб, используют продукты гидролиза углеводов хозяина [23]. Активность ферментов глюконеогенеза (глюкозо-6-фосфатаз и фруктозобисфосфатазы) и аденозинтрифосфатазы, участвующей в образовании и гидролизе молекул аденозинтрифосфата (АТФ), была обнаружена в цитозольных, митохондриальных и микросомальных фракциях цестоды *Bothriocephalus scorpii* (Müller, 1776) (Pseudophyllidea), паразитирующей в пилорических придатках бычка *Myoxocephalus brandti* (Steindachner, 1867) [5, 63]. У ленточных червей отряда циклофиллид (Cyclophyllidea) *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) обнаружены все ферменты гликолиза, цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и пентозофосфатного пути [250]. Для получения глюкозы, как одного из необходимых питательных веществ, от своего хозяина, в тегументе ленточных червей *E. multilocularis* (Leuckart, 1863) была обнаружена экспрессия генов белков-переносчиков глюкозы EmGLUT1 и EmGLUT2 [124].

Ленточные черви не способны *de novo* синтезировать жирные кислоты (ЖК) и холестерин, поскольку у них отсутствуют гены ферментов скваленсинтазы и скваленмонооксигеназы [223, 250]. Недостаток ЖК и холестерина цестоды восполняют за счет организма хозяина, на что указывает наличие в геноме *E. granulosus* последовательностей, кодирующих цитоплазматическую ацил-СоА холестеринацилтрансферазу (АСАТ), трансмембранную холестеринэстеразу, белки-переносчики жирных кислот, ферменты элонгации углеродной цепи жирных кислот, липазы, рецептор липопротеинов низкой плотности и АТФ-связывающие кассетные транспортеры. Кроме того, были обнаружены несколько семейств генов, специфичных для ленточных червей, таких как белок, связывающий жирные кислоты (ФАВР), и аполипопротеиновый антиген В [223, 250].

Ленточные черви утратили способность синтезировать некоторые аминокислоты. У цестод *E. multilocularis* отсутствуют ферменты биосинтеза серина и пролина [223], а в геноме *E. granulosus* отсутствуют многие гены, связанные с синтезом *de novo* большинства аминокислот, за исключением аланина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты, пуриновых и пиримидиновых оснований [248, 250]. Также было показано, что плероцеркоиды ремнеца

Schistocephalus pungitii (Dubinina, 1959), паразитирующего в печени девятииглой колюшки *Pungitius pungitius* L. метаболически зависят от хозяина в обеспечении пуриновыми основаниями [9]. Для цестод характерна потеря большей части генов, связанных с функционированием пероксисом - органелл, участвующих в окислительном метаболизме липидов и детоксикации активных форм кислорода (АФК) [223]. В геноме цестод *Taenia solium* L., *E. multilocularis*, *E. granulosus*, *Hymenolepis microstoma* (Dujardin, 1845) выявлено отсутствие генов пероксинов Pex3 и Pex19, необходимых для биогенеза пероксисом [247].

Важное место в жизнедеятельности паразитических червей занимают протеолитические ферменты, которые участвуют в развитии и питании, тканевой и клеточной инвазии, миграции через ткани хозяина, блокировании каскадов свертывания крови и уклонение от иммунитета хозяина. У ленточных червей протеиназы широко распространены и главным образом представлены серин-, аспарагин-, цистеин- и металлопротеиназами [84, 243]. Наличие протеолитической активности экспериментально было показано у цестод *Triaenophorus nodulosus*, *Eubothrium rugosum* (Batsch, 1786), *Cariophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781), *Alcataenia larina* (Krabbe, 1869) и *Tetrabothrius minor* (Lönnerberg, 1893) [16, 22]. Сериновые протеазы были описаны у паразитических червей различных систематических групп на различных стадиях развития, включая цестод *Spirometra mansoni* (Joyeux and Houdemer, 1928), *E. granulosus* и *Schistocephalus solidus* (Müller, 1776) [244]. Активность протеолитических ферментов у *S. solidus* на различных стадиях онтогенеза различалась (процеркоиды, синцитиальный покров плероцеркоидов и взрослых особей) [182]. Процеркоиды по сравнению с плероцеркоидами и взрослыми особями *S. solidus* отличались наличием химотрипсиноподобной протеиназы, проявляющей коллагенолитическую активность, которая, возможно, необходима для проникновения через стенку кишечника хозяина. У плероцеркоидов и взрослых особей паразита были обнаружены лейцинаминопептидазы (LAP), способствующие питанию паразита путем деградации олигопептидов на поверхности тегумента [182]. У цестоды *Triaenophorus nodulosus* взрослые особи, которые паразитируют в кишечнике щуки *Esox lucius* L., были выделены и идентифицированы два новых ингибитора протеаз типа Кунитца, потенциально ответственных за ингибирующую способность цестод против трипсина хозяина [191]. В тегументе и крючках протосколексов, в зародышевом листе и паренхиматозной ткани взрослых особей *E. granulosus* [242] были обнаружены лейцинаминопептидазы. На поверхности протосколексов *E. granulosus* LAP участвуют в процессе абсорбции питательных веществ и переваривании белков, а также в фиксации паразита на слизистой оболочке кишечника хозяина. Активность LAP в паренхиматозной ткани и тегументе взрослых червей гельминта, связана с участием данных ферментов во взаимодействии паразита с хозяином, питании и уклонении от иммунных реакций хозяина [242].

У плоских червей, ведущих паразитический образ жизни, по сравнению с другими представителями билатеральных организмов (Bilateria), наблюдается сокращение количества семейств генов гомеобокса, которые участвуют в регуляции процессов развития организма [223]. Цестоды характеризуются специфичной потерей семейства генов *mnx*, *rax3/7*, *gbx*, *hbn* и *gax*, участвующих в развитии нервной системы, и генов кластера ParaHox (*gsx*, *pdx*, *cdx*), которые вовлечены в процессы формирования сквозного пищеварительного тракта [223].

Одной из наиболее широко представленных групп белков у ленточных червей являются белки, которые защищают их от различных стрессовых факторов окружающей среды. Белки теплового шока (HSP, heat shock proteins) — это класс консервативных среди живых организмов белков, которые локализируются в различных компартментах клетки (эндоплазматический ретикулум, митохондрии, цитозоль). Функции HSP направлены на обеспечение правильной укладки формирующихся аминокислотных цепей в белке, транслокацию белков через мембраны, дезагрегацию белков, сохранение и изменение структур цитоскелета и мечение поврежденных белков для их дальнейшей деградации [224]. В геноме цестод *Echinococcus* spp. и *T. solium* содержатся копии генов HSP70 цитозольной клады в отличие от плодовых мух *D. melanogaster* и человека. Активная индукция белков HSP70 и HSP80 у *T. solium* наблюдалась при температурном стрессе [228]. Белки HSP40 предотвращают агрегацию белков и регулируют рефолдинг белков в процессе развития паразитических организмов [76], а HSP90 участвуют в регуляции конформационных изменений белков и трансдукции клеточного сигнала [89, 125]. Универсальные стрессовые белки (USP) присутствуют у бактерий, архей, эукариот. Синтез белков USP индуцируется в ответ на различные стрессовые факторы, такие как окислительный стресс, тепловой шок и воздействие ультрафиолета [88]. Гены, кодирующие универсальные стрессовые белки присутствуют в геномах цестод различных видов (*E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. canadensis*, *T. solium*, *H. microstoma*).

К защитным биохимическим механизмам также относится система биотрансформации ксенобиотиков (СБК), которая представляет собой последовательный каскад реакций, направленных на снижение токсичности химически активных молекул, попадающих в организм из внешней среды или образующихся как побочные продукты обмена веществ. В I фазе СБК ксенобиотики подвергаются окислительным, восстановительным или гидролитическим превращениям с участием ряда ферментов, основным из которых является микросомальная монооксигеназа - цитохромами P-450 (CYP) [80, 241]. CYP широко распространены среди живых организмов, но долгое время считалось, что паразитические черви лишены данных ферментов. Однако позже было показано, что гены, кодирующие цитохром P-450, присутствуют в геноме нематод и трематод [80, 156]. Цестоды имеют лишь один ген CYP в

отличие от свободноживущих плоских червей [175], что говорит о более низкой их способности окислять ксенобиотики и стероиды [80]. Окисление ксенобиотиков у гельминтов также могут катализировать флавиносодержащие монооксигеназы (ФМО) [80], которые являются консервативными ферментами и обнаруживается у многих групп живых организмов, в том числе и цестод, таких как *Moniezia expansa* (Rudolphi, 1810) [185] и *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819) [164]. Во II фазе биотрансформации ксенобиотиков происходит конъюгация в реакциях глюкуронирования, сульфатирования, ацетилирования, метилирования или гликозилирования метаболитов, которые образовались в первой фазе [80]. Одним из основных ферментов второго этапа СБК является глутатион S-трансфераза (GST), катализирующая трансформацию эндогенных и ксенобиотических соединений при конъюгации электрофильных субстратов с трипептидом глутатионом [32, 80, 183]. У большинства паразитических червей, в том числе и цестод, были обнаружены и идентифицированы GST нескольких классов (Sigma (S), Mu (M), Pi (P) и Nu (N)) [80, 167, 213, 232, 233, 238]. В фазе III биотрансформации ксенобиотиков образовавшиеся конъюгаты и метаболиты выводятся из клеток с помощью специальных мембранных транспортных белков [32, 80]. АТФ-связанные кассетные транспортеры (ABC) являются основным семейством транспортеров-экспортеров, обнаруженные во всех клетках живых организмов. В метаболизме ксенобиотиков ABC обеспечивают активный отток из клеток как липофильных ксенобиотиков, прошедших через плазматические мембраны, так и гидрофильных метаболитов и конъюгатов, образованных под действием ферментов биотрансформации. Наиболее изученным АТФ-связанным кассетным транспортером является Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1). Кодированные Pgp гены были обнаружены у цестод *E. granulosus* [168].

Антиоксидантная система (АОС) цестод играет важную роль в их защите против активных форм кислорода, образующихся в процессе метаболизма гельминтов и продуцируемых эффекторными клетками хозяина (макрофагами, нейтрофилами и эозинофилами). АОС включает ряд ферментов, таких как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза (GPx), ксантинооксидаза, цитохром с пероксидаза и пероксиредоксины (Prxs). Компоненты антиоксидантной системы действуют на различных линиях защиты - от предотвращения образования активных форм кислорода до восстановления радикалов. Супероксиддисмутаза локализуется в митохондриях, цитозоле клетки и внеклеточной среде, где катализирует реакции дисмутации супероксида в перекись водорода [73], после чего образовавшаяся перекись водорода превращается в воду под действием каталазы. Ферменты семейства пероксиредоксинов участвуют в реакциях обезвреживания гидропероксидов, которые восстанавливаются на счет сульфгидрильных групп фермента [106]. Антиоксидантная система различных видов цестод характеризуется специфичным для них

составов и активностью ее компонентов [84]. СОД и Prxs, вероятно, являются основными ферментами обезвреживания перекиси водорода у паразитических червей [84]. У цестод были идентифицированы различные антиоксидантные ферменты: у *Taenia taeniaeformis* описана Cu/Zn-СОД [142], у *E. granulosus* показана ферментативная активность как СОД [196], так и тиоредоксин пероксидазы [69, 195], у *E. multilocularis* - GST [145]. В жидкости цист *Taenia hydatigena* (Pallas, 1766) была обнаружена высокая концентрация каталазы. Каталаза участвует в деградации пероксида водорода, а также превращении оксида азота NO в диоксид NO₂ [92]. Оксид азота продуцируются иммунными клетками хозяина (малыми перитонеальными макрофагами) во время заражения цестодой рода *Echinococcus* [40, 222, 250]. Таким образом, повышение синтеза каталазы, вероятно, помогает метацестодам *T. hydatigena* противостоять иммунным атакам хозяина.

Таким образом, цестоды характеризуются специфическими особенностями метаболизма и физиологии, отличающими их от других представителей типа Плоские черви. Среди таких особенностей можно выделить адаптационные изменения пищеварительной, антиоксидантной и репродуктивной систем. Однако, в протеомах цестод можно выделить доминирующие группы белков: структурные и двигательные белки, белки, отвечающие за устойчивость к стрессу и ферменты энергетического обмена.

1.2 Исследования белкового состава цестод на различных стадиях жизненного цикла

Для ленточных червей характерен сложный жизненный цикл, включающий ряд последовательно сменяющихся стадий развития, в результате чего среда первого и второго порядка цестод постоянно меняется и характеризуется специфическими условиями на каждой фазе развития. Также все цестоды являются уникальной группой паразитов, которые, вне среды первого порядка не способны на размножение, поскольку метаболически и экологически зависят от хозяина. Онтогенетическое развитие псевдофиллидных цестод *Triaenophorus* spp. и *Schistocephalus* sp. характеризуется последовательной сменой нескольких стадий, которые различаются по длительности, срокам наступления инвазионного состояния и завершения созревания паразита [23]. Эмбриональное развитие яиц протекает в водной среде и завершается образованием корацидиев у *Triaenophorus* spp. в течение 1-10 дней, а у *Schistocephalus* sp. в течение 1-5 дней, в зависимости от температуры среды. После корацидии попадают в пищеварительную систему веслоногих рачков (первый промежуточный хозяин), проникают в

стенку кишечника, где у них происходит морфогенез, и на 7-10 день окончательно формируется инвазионная личинка - процеркоид. Зараженных рачков с пищей заглатывают рыбы, в организме которых происходит развитие процеркоидов до следующей фазы - плероцеркоида. На этой стадии виды *Triaenophorus* spp. и *Schistocephalus* sp. различаются, тем, что у плероцеркоидов *Schistocephalus solidus* в организме второго промежуточного хозяина (трехиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* L.) в течение 57 дней происходит рост, морфофизиологическая перестройка и полный органогенез половой системы, а у *Triaenophorus* spp. на данной стадии наблюдается только увеличение размеров тела, утолщение покровных тканей, формирование пучков поперечной и продольной мускулатуры и формирование выделительной системы и органов прикрепления. При достижении инвазионного состояния плероцеркоиды паразитов попадают в организм окончательного хозяина. Для цестод *Triaenophorus* spp. окончательным хозяином является щука *Esox lucius* L. (паразитируют в кишечнике рыбы). Эта стадия развития у *Triaenophorus* spp. самая длительная (5-8 месяцев), в течение которой происходит полный органогенез и окончательное созревание червей, что включает несколько стадий: 1 - незрелые черви, гонады не развиты; 2 - начинают закладываться гонады начиная с дистальных сегментов, формируется циррус, семенники, яичники и матка; 3 - половая система развита полностью, яиц еще нет; 4 - формирование яиц в матке и выброс их наружу; 5 - черви дегенерируют и покидают кишечник рыбы. Дефинитивным хозяином для *S. solidus* являются рыбацкие птицы, в кишечнике которых в течение 1-2 недель паразитируют и продуцируют яйца половозрелые особи цестоды [11].

Для псевдофиллидной цестоды *Spirometra erinacei* (Rudolphi, 1819) была показана вариабельность белкового состава червей на различных стадиях жизненного цикла (зрелые и ювенильные особи, полученные из тонкого кишечника кошки после 8 и 21 дней заражения соответственно) [126]. Белковые профили зрелых и ювенильных особей *S. erinacei* различались по содержанию 8 белков (альфа-цепь митохондриальной пропионил-СоА-карбоксилазы, предшественник белка, содержащего домен тиоредоксина 5, туфтелин-взаимодействующий белок 11, белок цинкового пальца 227, мышечный белок небулин, синатаксин хеликазы, метастаз-ассоциированный белок 3, пептидил-пролил-цис/транс-изомераза С), которые являются участниками метаболизма ДНК и РНК, клеточного транспорта, формирования цитоскелета, процессинга и деградации белка, энергетического обмена и окислительного стресса. Анализ экспрессируемых последовательностей EST (expressed sequence tags) *Spirometra erinacei* выявил у личинок гельминта наличие высокоэкспрессированных транскриптов, которые были представлены генами, кодирующими фруктозо-бисфосфатальдозу, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, фактор роста плероцеркоида/цистеиновую протеазу и субъединицу 3 сигнального пептидазного комплекса, а наиболее экспрессируемым был ген

гликопротеина фибронектина 1 (FN1) [125]. Функции FN у паразитических червей слабо изучены, но предполагается, что он участвует в клеточной адгезии, передаче сигналов при клеточной пролиферации и апоптозе, а также проявляет активность против иммунной системы хозяина. У плероцеркоидов *Spirometra erinacei* также были обнаружены гены белков теплового шока различных классов (HSP70, HSP40, HSP90, HSP71, HSP105, HSP60 и HSPA8), из которых преобладали HSP70, HSP40 и HSP90.

Цестода *Schistocephalus solidus* (Pseudophyllidea) и его второй промежуточный хозяин трехиглая колюшка *Gasterosteus aculeatus* L. являются модельными объектами для изучения особенностей биологии и экологии паразитических червей и отношений в системе «паразит-хозяин» [44, 50, 99, 207, 208]. У *S. solidus* наиболее активные морфофизиологические изменения протекают на стадии плероцеркоида, когда полностью формируется половая система и происходит активный рост червя. Плероцеркоиды становятся инвазионными для дефинитивного хозяина (рыбоядные птицы), когда их масса достигает 50 мг. При попадании инвазионных плероцеркоидов в пищеварительный тракт теплокровного хозяина запускается процесс формирования и выброса яиц, стимулом для чего является повышение температуры среды паразита до 40-42°C. Согласно результатам физиологических и морфологических исследований, различия между инвазионными и неинвазионными плероцеркоидами обусловлены процессами роста и развития органов гельминта [74]. Эксперименты *in vitro* показали, что количество проглоттид в стробиле *S. solidus* прекращает увеличиваться уже через 48 часов после заражения второго промежуточного хозяина. Для плероцеркоидов *S. solidus* характерно увеличение массы за счет роста мышечной ткани, а не появления новых проглоттид, что говорит о том, что процессы развития органов и дифференциации тканей на данной стадии «выключены», а синтеза и роста мышц, наоборот, «включены» [74, 110]. У неинвазионных плероцеркоидов три из четырех активных модулей коэкспрессии генов были связаны с ростом, делением клеток и регуляторными функциями [104]. Первый модуль включал гены, связанные с метаболизмом ДНК и РНК (репликация, транскрипция и трансляция). Второй блок, активируемый у неинвазионных плероцеркоидов, содержал гены, участвующие в регуляции клеточного цикла и деления клеток, а гены третьего модуля коэкспрессии были связаны с регуляторными процессами клеточных функций, таких как апоптоз, митоз, фосфорилирование и деление клеток. Было выдвинуто предположение, что у неинвазионных плероцеркоидов *S. solidus* усиливаются регуляторные процессы, которые приводят к быстрому увеличению общей массы тела гельминта за счет дифференциации тканей, синтеза мышечных волокон, формирования и увеличения размера органов [104]. Несмотря на единый план строения и идентичную среду обитания, неинвазионные и инвазионные личинки *S. solidus* существенно различаются по своему метаболическому статусу.

Изучен транскриптомный ответ *S. solidus*, развивающийся при попадании инвазионного плероцеркоида в организм дефинитивного теплокровного хозяина (птица) [104]. На уровне транскриптома метаболизм половозрелых особей *S. solidus* характеризовался активацией репродуктивных процессов и окислительно-восстановительного гомеостаза. При развитии взрослых особей *S. solidus* в организме окончательного хозяина основная часть биологической активности паразита сдвигалась от процессов роста и защиты от иммунных реакций хозяина в сторону процесса размножения [103, 110, 111, 211]. При смене фазы жизненного цикла гельминта от инвазионной личинки до взрослого червя наблюдалось повышение экспрессии генов, связанных с репродуктивными функциями (дифференцировка ядра сперматид, подвижность сперматозоидов, секреция лютеинизирующего гормона и положительная регуляция секреции тестостерона), и сдвиг в энергетическом обмене, характеризующийся различиями в регуляции некоторых реакций метаболизма глюкозы [104, 130]. У взрослых особей *S. solidus* наблюдалась активация первого этапа распада гликогена (превращение гликогена в глюкозо-1-фосфат), катализируемого ферментом гликогенфосфорилазой, что свидетельствует о повышенном использовании запасов гликогена на этой стадии [199]. При этом у взрослых червей первые три реакции гликолиза, приводящие к распаду глюкозы на более простые сахара, были подавлены, а гены, кодирующие фермент фруктозо-бисфосфатальдолазу, наоборот были активированы. Большинство метаболических путей, ведущих к продукции пирувата, подавлялись, за исключением фермента енолазы, ответственного за предпоследнюю стадию гликолиза (превращение глицерат-2-фосфата в фосфоенолпируват). Также у взрослых особей *S. solidus* была обнаружена активация экспрессии гена, кодирующего L-лактатдегидрогеназу, фермента, ответственного за превращение пирувата в лактат при низком содержании кислорода в среде, что согласуется с полуанаэробными условиями обитания паразита в кишечнике птицы [206]. Половозрелые особи *S. solidus* отличались от инвазионных плероцеркоидов повышенным уровнем экспрессии специфичного для семенников гена, кодирующего глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу, что возможно указывает на активное производство сперматозоидов с целью ускорения процесса оплодотворения яйцеклеток [104]. Для взрослых червей *S. solidus* по сравнению с инвазионными личинками также было показано преобладание биологических процессов, связанных с эндоцитозом, таких как сборка клатриновой оболочки, клатрин-опосредованный эндоцитоз и регуляция эндоцитоза.

Циклофиллидные цестоды рода *Echinococcus* spp. являются эпидемиологически важными, опасными для человека паразитами и широко распространенными объектами изучения различных аспектов биохимии цестод, в том числе и особенностей их белкового состава. Жизненный цикл эхинококков протекает при смене двух хозяев (промежуточного и

окончательного), которые преимущественно представлены теплокровными животными. Личиночная стадия *Echinococcus* spp. (эхинококковая киста или ларвоциста), развивается преимущественно в печени и легких промежуточных хозяев [198]. Ларвоциста представляет собой капсулу, состоящую из внутреннего зародышевого (герминального слоя), внешнего бесклеточного слоистого слоя (фиброзного слоя), внутренней жидкости и непосредственно протосколексов паразита [108, 163]. Белковый состав стенки ларвоцист *E. granulosus* представлен такими белками как актин, специфичный белок тегумента EgTeg, параамиозин, кальций-связывающий белок, глутатион S-трансфераза, тиолпероксидаза, ферритин и ряд ферментов энергетического обмена (цитратсинтаза, фруктозодифосфатаальдолаза, митохондриальная НАДФ⁺ изоцитратдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа (ЛДГ), малагдегидрогеназа (МДГ), орнитинаминотрансфераза, фосфоенолпируваткарбоксилаза (ФЕПК), пируватдегидрогеназа, УДФ-глюкозо-4-эпимераза). В протеоме протосколексов *E. granulosus* преобладают цитоскелетные белки, ферменты посттрансляционной модификации и обмена белков, белки теплового шока, участники обмена углеводов (ФЕПКК, 6-фосфофруктокиназа (ФФК), гексокиназа, пируваткиназа (ПК)), передачи сигнала и трансляции, ингибиторы протеиназы типа Кунитца, иммуномодулирующие белки, глутатион S-трансфераза, аннексин А13, тетраспанины, кальпаины, лейциламинопептидазы, кальциневрин В, тиоредоксин-глутатионредуктазы и другие белки [79, 108, 163]. Протосколексы *E. multilocularis* характеризуются преобладанием в составе протеома цитоскелетных белков (актин, тропомиозин, параамиозин, β -тубулин и актин-связывающий белок) и белков теплового шока (HSP70, GRP78 и HSP20) [240], а также и у них были идентифицированы GST, тиоредоксин пероксидаза и транскетолаза, которые принимают участие в выживании паразита в условиях стресса, вызванного иммунной реакцией хозяина на инвазию [52, 204, 233]. В герминальном слое ларвоцисты *E. granulosus* преобладали белки, участвующие в метаболических процессах, производстве и преобразовании энергии, что объясняется пролиферативной функцией данного слоя при формировании протосколексов и росте цисты [163]. Ряд белков, таких как параамиозин, тиоредоксонпероксидаза, актин, фруктозо-бисфосфатаальдолаза и цитрат-синтазы были обнаружены во всех морфологических компонентах цисты *E. granulosus*. Гидатидная жидкость, заполняющая эхинококковую кисту *E. granulosus*, представляет собой сложную биологическую смесь, которая включает в себя широкий спектр белков [43], среди которых были обнаружены тиоредоксин, рецепторы липопротеинов низкой плотности, циклофилин и ферритин, а наиболее распространенными белками были антиген 5 и антиген В. Результаты исследования белковых профилей морфологических структур ларвоцист *Echinococcus* spp. наглядно демонстрируют их функциональную специфичность, направленную на поддержание жизнедеятельности паразита на данной стадии развития. Протеомы половозрелых червей *E. granulosus* характеризуются

преобладанием структурных белков (парамиозин, актин, миозин, миофилин, тубулин бета 2), ферментов энергетического обмена (фосфоенолпируваткарбоксикиназа, фруктозобифосфатальдолаза, енолаза, фосфоглицераткиназа (ФГК) и малатдегидрогиназа), главного белка цитоплазматического рибонуклеопротеина vault (major vault protein) и гипотетического белка EgrG_000393000.1 [79]. Фермент фосфоенолпируваткарбоксикиназа (ФЕПКК), который участвует в экскреторных процессах, эндокринных путях и метаболизме углеводов, был идентифицирован как у протосколексов, так и у половозрелых червей *E. granulosus*, что подчеркивает важность этого белка на всех стадиях развития гельминта. У взрослых червей наряду с протосколексами паразита была обнаружена экспрессия белка HSP70, триозофосфатизомеразы, белков семейства 14-3-3 и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФДГ) [70, 79].

Для тетратиридий *Mesocostoides corti* характерно преобладание белков, функции которых связаны с метаболизмом, процессами роста и бесполого размножения, а специфичными для данной стадии были белки альфа-L-фукозидаза, L-лактатдегидрогеназа и гликозид-гидролаза, белки связанные с передачей сигналов (ras белок let-60, gab-17, белок ab-15, интегрин альфа-5 и интегрин бета-подобный белок) и регуляторные белки PP1 и PP2A [65]. У взрослых особей *M. corti* преобладали белки, участвующие в биосинтезе макромолекул, экспрессии генов и путях, которые предположительно связаны с сегментацией тела и половой дифференциацией. Специфичными для взрослых червей были белки, связанные с экспрессией генов, синтезом и обменом белков, факторы инициации трансляции, рибосомные белки, тРНК-синтетазы и тРНК-лигазы, шапероны (пептидил-пролил цис-транс-изомераза, эндоплазмин и белки T-комплекса) и протеолитические ферменты [65].

Таким образом, у цестод смена фаз развития сопровождается не только активными морфофизиологическими, но и метаболическими изменениями, которые выражаются в наборе синтезируемых паразитами белков. Созревание гельминтов, главным образом, характеризуется усилением синтеза белков, участвующих в процессах получения энергии, дифференцировки клеток, роста и белковом обмене.

1.3 Изучение белкового состава секреторно-экскреторных продуктов цестод

Во время инвазии паразит и его хозяин взаимодействуют друг с другом посредством различных молекул, которые представлены их экскреторно-секреторными продуктами, в том числе и белками. Совокупность экскреторно-секреторных белков (ЭСБ), называемого

секретомом, является частью протеома и играет важную роль в поддержании процесса паразитирования [190, 214].

Паразитические черви секретируют молекулы, которые действуют как манипулятивные агенты, то есть вызывают физиологические и поведенческие изменения в организме их хозяев. В секретоме плероцеркоидов *Schistocephalus solidus* были обнаружены белки, функции которых предположительно связаны с процессами моделирования поведения его второго промежуточного хозяина - трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. Экскреторно-секреторные белки гельминта включали протеазы, белки с нейронными и иммунными функциями, белки, участвующие в клеточных взаимодействиях, и многие из них являются видоспецифичными [49]. Плероцеркоиды *S. solidus* также способны менять скорость и траекторию движения колюшки, что в свою очередь формирует социальное поведение рыб в стае [120]. У колюшек, зараженных *S. solidus*, по сравнению с незараженными рыбами, были показаны изменения в активности компонентов моноаминергической системы их головного мозга [174]. Известно, что гельминты синтезируют белки подобные белку семейства Wnt, участвующие в передаче сигналов, которые могут напрямую влиять на некоторые функции центральной нервной системы (ЦНС) хозяина. Исследования, направленные на изучении белков, связанных с нейрогенезом и нейротрансмиттерами, в том числе выявлении роли различных модификаций в пути передачи сигналов Wnt, которые имеют решающие функции в центральной нервной системе хозяина, важны для понимания особенностей отношений в системе паразит-хозяин [55, 56, 103].

В секретоме метацестод *T. solium*, который был получен при инкубации цистицерков в культуральной среде, извлеченных из мышечной ткани свиней, были идентифицированы как белки паразита, так и белки его хозяина [234]. Среди белков свиньи были выявлены иммуноглобулины (Ig), гемоглобин, ингибиторы эндопептидаз, аденозингомоцистеиназа, углеродная ангидраза 3, цистеинкиназа типа М, аполипептопротеин А-І, транстретин, гемопексин, сывороточный альбумин, трансферин, гаптоглобин, трипсин, альфа-1-антитрипсин, ингибитор эластазы лейкоцитов, тяжелая цепь интеральфа-ингибитора трипсина, альфа-2-НС-гликопротеин и пептид протегрин. Белки хозяина могли попасть в секреторные продукты *T. solium* как в виде контаминация, так и в результате поглощения их гельминтом во время инвазии. Экскреторно-секреторные белки *T. solium* можно разделить на следующие группы согласно их функциональной аннотации: ферменты гликолиза (енолаза, глюкозофосфат изомераза, фосфоглицерат киназа) и глюконеогенеза (ФЕПК); полипептиды, участвующие в передаче сигнала (14-3-3 белок, ГТФаза); транспортные белки, связывающие жирные кислоты и кальций (аннексин, кальций-связывающий белок), актин-связывающие белки, ДНК-связывающие, кислород- и антиген-связывающие белки); белки антиоксидантной системы

(GST, цитозольная Cu/Zn-супероксиддисмутаза) и белки с оксидоредуктазной активностью (ферритин, альдо-кеторедуктаза); белки фолдинга (циклофилин, кальретикулин) и шапероны (HSP70 и HSP90); протеолитические ферменты цистеинового (катепсин L-подобная цистеин протеаза) и треонинового типа (протеасомная субъединица альфа) Также как и в содержимом цисты *E. granulosus*, в составе секрета *T. solium* присутствовало много структурных и мышечных белков (парамиозин, динеин, тубулин, актин и т.д.). Секретом взрослых особей циклофиллидных цестод *Hymenolepis diminuta* также включали белки, участвующие в различных биологических процессах, таких как фосфолипид-транслоцирующая активность АТФаз, метаболизм азотистых соединений, биосинтез, первичный метаболизм, клеточный рост, метаболизм органических веществ, клеточный метаболизм, биологическая регуляция и другие. Ряд ЭСБ гельминта, такие как шапероны и белки, участвующие в ответных реакциях на окислительный стресс (пероксидазин), а также ферменты углеводного обмена (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), вероятно проявляют иммуномодулирующую функцию [53].

На основе анализа транскриптомных профилей протосколексов *E. granulosus* выявлены экскреторно-секреторные белки паразита, участвующие в процессах его метаболической адаптации [178]. Среди секретируемых белков *E. granulosus* были высоко экспрессированы компоненты, которые участвуют в метаболизме углеводов, что указывает на то, что данные паразитические черви выработали оптимальную стратегию получения энергии за счет организма хозяина. У *E. granulosus* обнаружены 9 ферментов, связанных с гликолизом, в том числе лимитирующие ферменты (rate-limiting enzymes) 6-фосфофруктокиназа и пируваткиназа. В результате гликолиза могут синтезироваться незаменимые аминокислоты (глутамин, аспарагиновая кислота, аргинин, пролин, гистидин, аланин, тирозин и цистеин), жирные кислоты, аденин и гипоксантиновые нуклеотиды и пиримидин для поддержания процессов развития и роста гельминта. Глюкоза и другие углеводы также могут быть синтезированы в процессе глюконеогенеза при наличии альтернативных источников углерода, таких как глюкогенные аминокислоты, лактат и глицерин. Ферменты ЦТК, такие как аконатгидратаза, сукцинатдегидрогеназный комплекс, малатдегидрогеназа, были идентифицированы как секретируемые белки *E. granulosus*.

Во время инвазии иммунная система хозяина реагирует на присутствие паразита, что влияет на рост и развитие последнего [177, 249]. В свою очередь гельминты выработали эффективные механизмы уклонения от неблагоприятного влияния компонентов иммунной системы хозяина. Среди секретируемых белков *E. granulosus* в большом количестве идентифицированы шапероны HSP90, HSP40, GrpE (Gro-P like protein E), Grp96, универсальный стрессовый белок и кальретикулин. В выживании гельминта также важными компонентами являются антиоксидантные ферменты, участвующие в детоксикации активных форм кислорода,

которые генерируются окружающей средой гельминта в ответ на инвазию. К секретируемым *E. granulosus* антиоксидантам относятся глутатионтрансфераза, пероксиредоксин, тиоредоксин, $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ супероксиддисмутаза и ингибитор белка синтазы нейронного оксида азота (neuronal nitric oxide synthase protein inhibitor).

Протеолитические ферменты обнаруживаются не только в соматических экстрактах гельминтов, но и в их секрете. Протеолитические ферменты участвуют в процессах питания гельминта, расщепляя белки хозяина до пептидов и аминокислот, доступных для поглощения паразитом, а также необходимы для проникновения червей через тканевые барьеры хозяина. Цестоды, обитающие в кишечнике, также секретируют специфические ингибиторы протеиназ, которые дезактивируют протеиназы пищеварительных соков хозяина, тем самым защищая себя от переваривания. Ингибиторы протеиназ гельминтов обладают иммуносупрессорным действием, снижая иммунную реакцию хозяина [72]. Для осуществления собственной протеолитической активности гельминтам необходимы уникальные по строению протеиназы, которые не ингибируются ферментами хозяина. *E. granulosus* может секретировать протеазы для переваривания белков хозяина или ингибиторы для защиты от переваривания эндогенными или производными протеиназами паразита [178].

Основываясь на литературных данных, можно сделать вывод, что паразитические черви выбрасывают в окружающие его ткани хозяина огромное количество биологически активных молекул. Со стороны паразита ЭСБ отвечают за поддержание эффективного и долгосрочного процесса паразитирования. Среди экскреторно-секреторных белков есть молекулы, способствующие питанию паразитов (ферменты гликолиза, метаболизма жирных кислот, транспортные белки), проникновению в организм хозяина (гликозилгидролазы и протеолитические ферменты), огромное количество защитных белков (антиоксидантные ферменты), иммуномодулирующие полипептиды, а также белки биологической регуляции, которые, вероятно, контролируют как развитие самого червя, так и могут влиять на его хозяина (цистатины, факторы транскрипции и др.) [53]. Также секретируемые белки могут действовать как факторы вирулентности и иммунорегуляторы, что чрезвычайно важно для выживания паразита в организме хозяина [93, 100]. В свою очередь, белки-хозяева в зоне взаимодействия в основном представлены структурными белками окружающих тканей в разной степени деградации под действием пищеварительных протеаз гельминтов, а также защитными белками неклочного и клеточного иммунитета.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования были выбраны псевдофиллидные (Pseudophyllidea) цестоды *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) и *T. crassus* (Forel, 1868) из семейства Triaenophoridae и *Schistocephalus solidus* (Müller, 1776) из семейства Ligulidae. Отряд Pseudophyllidea представлен паразитами различных классов позвоночных, но в основном паразитами костистых морских, проходных и пресноводных рыб. Представители семейства Triaenophoridae паразитируют у морских и пресноводных рыб, а для цестод семейства Ligulidae дефинитивными хозяевами являются теплокровные животные, которые заражаются плероцеркоидами данного гельминта от костистых рыб [13].

Жизненный цикл цестод *T. nodulosus* и *T. crassus* и *S. solidus* является сложным и включает смену трех хозяев (дефинитивного и двух промежуточных). Окончательным хозяином, в кишечнике которого происходит половое созревание цестод и продукция яиц, для гельминтов *Triaenophorus* spp. является щука *Esox lucius* L., а для *S. solidus* – водоплавающие рыбаобразные птицы (чайки, бакланы и другие). Яйца паразитов с фекалиями хозяина попадают в воду, где они в течение нескольких дней развиваются до стадии свободноплавающей личинки – корацидия. Корацидий в теле первого промежуточного хозяина (представители подкласса Веслоногие рачки (Copepoda)) переходит в стадию процеркоида. После чего, зараженные рачки попадают в организм второго промежуточного хозяина, в котором процеркоиды развиваются до плероцеркоида. Плероцеркоиды *T. nodulosus* паразитируют в печени рыб из различных семейств (Anguillidae, Cottidae, Cyprinidae, Gasterosteidae, Gobiidae, Gadidae, Esocidae, Salmonidae, Osmeridae, Percidae и другие), *T. crassus* - в мышцах рыб семейств Salmonidae и Osmeridae, а *S. solidus* – в брюшной полости трехиглой колюшки *G. aculeatus* [23, 74]. Затем гельминты попадают в пищеварительный тракт окончательного хозяина и цикл их развития завершается.

2.2 Секвенирование транскриптома *T. nodulosus*

Сбор материала, выделение и секвенирование РНК *T. nodulosus*. Плероцеркоидов *T. nodulosus* собирали из печени окуня *Perca fluviatilis* L., взрослых червей - из кишечника щуки

Esox lucius L., выловленных в Онежском озере в 2018 году. Видовое определение паразитов было проведено по морфометрии крючков сколекса [23, 133]. Червей извлекали из организма рыб, промывали в физиологическом растворе Тироде (0.800% NaCl, 0.020% KCl, 0.020% CaCl₂, 0.010% NaHCO₃, 0.010% MgCl₂, 0.005% NaH₂PO₄, 0.100% глюкоза), фиксировали и хранили в жидком азоте. Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора для очистки РНК GeneJET (Thermo Scientific) в соответствии с протоколом. Полученную смесь РНК плероцеркоидов и взрослых особей *T. nodulosus* использовали для приготовления библиотеки спаренных концевых фрагментов с помощью набора РНК TruSeq с полной цепью на секвенаторе HiSeq 400 (Illumina). В результате секвенирования РНК было получено 92 миллиона пар считываний.

Сборка транскриптома *T. nodulosus de novo* и его аннотация. Контроль качества считываний выполнялся с помощью программы FastQC. Непосредственно сборка *de novo* осуществлялась в программе Trinity v2.4.0 [98] с установленными параметрами по умолчанию, за исключением обрезки с помощью trimmomatic. Собранные контиги подвергали удалению оставшихся адаптеров и загрязнений согласно базе NCBI TSA. Технические характеристики сборки были оценены с помощью программы transrate, а полнота сборки была определена с помощью BUSCO v3.0.1. Сборка составила 160 тысяч транскриптов. Полнота сборки оценивалась как доля консервативных эукариотических генов и была равна 87.9%. Контиги были функционально аннотированы веб-сервисом FunctionAnnotator [72]. Почти 30 тысяч транскриптов (около 18% от общего количества транскриптов) имели лучшее совпадение с последовательностями Platyhelminthes, около 78 тысяч остались неаннотированными, и только для 638 (<0.4% от общего числа транскриптов) было обнаружено лучшее совпадение с последовательностями рыб. Таким образом, загрязнение материалом хозяина незначительно и не оказывало существенного влияния на дальнейшие анализы.

Предсказание протеома *T. nodulosus* и сравнение с протеомами других плоских червей. База данных предсказанных протеомов была получена путем генерации предполагаемых белковых последовательностей с помощью TransDecoder v5.5.0 [98]. Полученная база данных содержала 37780 последовательностей и использовалась для идентификации масс-спектров белков *T. nodulosus* в нашем исследовании. Для филогенетического анализа были взяты предсказанные протеомные последовательности *T. nodulosus* и всех других видов ленточных червей, доступных в базе данных WormBase на 15 апреля 2019 года. Предсказанные белковые последовательности были сгруппированы с помощью программы proteinortho [140]. Было обнаружено 70 общих ортологичных групп. Информативные части выравниваний были отфильтрованы с помощью программы Gblock и затем объединены для построения дерева с помощью IQ-Tree. Автоматический выбор модели

выполнялся с помощью ModelFinder [122]. Полученное филогенетическое дерево визуализировали с помощью пакета «ggtree» в программе R (ver.3.5.3).

2.3 Анализ белкового состава различных отделов тела плероцеркоидов и взрослых особей *T. nodulosus* и *T. crassus*

Сбор материала. Плероцеркоиды и взрослые особи *T. crassus* и *T. nodulosus* были собраны в июне 2017 и 2019 году в оз. Каменное (Заповедник "Костомукшский", Республика Карелия). Половозрелых особей *T. nodulosus* и *T. crassus* извлекали из кишечника щук *Esox lucius* L., промывали в охлажденном растворе Тироде (0.800% NaCl, 0.020% KCl, 0.020% CaCl₂, 0.010% NaHCO₃, 0.010% MgCl₂, 0.005% NaH₂PO₄, 0.100% глюкоза), осматривали под микроскопом и сортировали по видовой принадлежности по морфологическим признакам (форма крючьев), согласно общепринятой методике [23]. Затем у отобранных особей гельминтов с помощью хирургических ножниц отрезали примерно 0.3 см со стороны сколекса, 0.8-1 см после сколекса (незрелые членики) и 0.8-1 см с дистального конца стробилы (зрелые членики). Биологические образцы, содержащие сегменты различных отделов тела от 4-22 особей червей фиксировали в жидком азоте, где хранили до анализа. Цисты плероцеркоидов *T. nodulosus* извлекали из печени налима *Lota lota* L. при продавливании ее между двумя стеклами, после чего осматривали ткани под микроскопом. Плероцеркоидов извлекали из цист, промывали в растворе Тироде, отрезали у них сколекс (примерно 0.3 см). Сколексы и оставшихся части стробилы, содержащие незрелые проглоттиды, были собраны от 7-19 червей и зафиксированы в жидком азоте до дня анализа. Плероцеркоидов *T. crassus* извлекали из мышц сига обыкновенного *Coregonus lavaretus* L. аналогичным образом (плероцеркоиды без цист).

Выделение и очистка водорастворимых белков плероцеркоидов и взрослых особей *T. nodulosus* и *T. crassus*. Для выделения белков из тканей *T. nodulosus* и *T. crassus* использовали метод получения тотальных лизатов путем гомогенизации в лизирующем буфере (2 М тиомочевина (Sigma), 7 М мочевины (Amresco), 4% CHAPS (Amresco), 30 мМ Трис (Sigma)) с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Abcam). Такой метод позволяет получить наиболее интактный протеом – денатурация белков происходит одновременно с их декомперментализацией (гомогенизацией ткани), что минимизирует возможность неспецифичной модификации белков. К одному объему ткани добавляли четыре объема лизирующего буфера, после чего пробы помещали в жидкий азот и гомогенизировали с

использованием шаровой мельницы Retsch MM400. В полученных тотальных лизатах измеряли белок по методу Бредфорда [60] с использованием планшетного сканера Epoch 2.

Разделение белков плероцеркоидов и взрослых особей *T. nodulosus* и *T. crassus* в полиакриламидном геле (ПААГ) по технологии 2D-DIGE. Двумерный электрофорез по технологии DIGE (Differential Gel Electrophoresis) предполагает использование различных флуоресцентных меток, которые конъюгируют различными образцами [235]. В результате на один гель можно нанести смесь из двух образцов (каждый со своей меткой), что полностью нивелирует технический шум системы, являющийся главной проблемой двумерного электрофореза. Также использовался внутренний стандарт, единый для всей серии экспериментов, окрашенный третьим флуорофором, позволяющий снижать вариабельность, связанную с некоторой неоднородностью характеристик электрофоретической подвижности образцов на разных гелях. Использование внутреннего стандарта позволяет проводить не только качественные, но и количественные сравнения между образцами на разных гелях [235]. Непосредственно перед процедурой изофокусирования проводили конъюгирование образцов со специальными флуоресцентными метками – cyanine (Cy) 2, 3 и 5 (Lumiprobe). Метки разработаны таким образом, чтобы не оказывать влияние на изоэлектрическую точку белка и практически не менять молекулярной массы белка (изменения электрофоретической подвижности ниже, чем разрешение электрофореза по Лэммли). Для этого 35 мкг белка из каждого образца смешивали с 280 пмоль Cy 3 или Cy 5. Помимо двух образцов сравнения на каждый гель наносился внутренний стандарт, содержащий по 35 мкг белка из каждого образца, использованного в анализе. Внутренний стандарт смешивали с Cy 2 из расчета 280 пмоль/35 мкг белка. Образцы конъюгировали с флуоресцентными метками в течение 45 минут на льду. Не связавшийся краситель связывали лизином, добавив 10 мкмоль L-лизина (Sigma) и инкубируя образцы на льду в течение 15 минут. После образцы, которые в дальнейшем будут нанесены на один гель, смешивали, добавляли амфолиты (BioRad) и DTT (Amresco) до 0.2% и 50 ммоль соответственно, и доводили суммарный объем пробы до 100 мкл. Затем проводили пассивную регидратацию гель-иммобилизованного градиента pH (pH 3-10, 7 см, BioRad) в течение ночи при комнатной температуре [235]. На гели наносили 105 мкг образца. Изоэлектрофокусирование проводили в ячейке IEF Cell (BioRad) при температуре 20°C, в «rapid» режиме набора напряжения с максимальной величиной напряжения 4000 V и ограничением силы тока 50 мкА/стрип, в течение 10000 V/h. После изоэлектрофокусировки проводили восстановление белков, алкилирование цистеинов и денатурацию белка с SDS (sodium dodecyl sulfate). Восстановление проводили в буфере с дитиотреитолом (ДТТ) pH 8.8 (6 M мочевины, 0.375 M Трис, 2% SDS, 20% глицерин, 2% ДТТ) в течение 15 минут, после чего для алкилирования цистеинов образцы переносили в буфер с иодацетамидом pH 8.8 (6 M

мочевина, 0.375 М Трис, 2% SDS, 20% глицерин, 2.5% иодацетамида) и инкубировали их в течение 15 минут [107]. Второе направление электрофоретического разделения проводили по методу Лэммли (12% разделяющий и 4% концентрирующий гели) в трис-глициновом буфере pH 8.3 (25 mM трис-HCl (Sigma), 192 mM глицин (Sigma), 0.1% SDS (Amresco)) при напряжении 200 V [137]. Работа была выполнена на базе Ресурсного Центра Методов анализа состава вещества Научного парка СПбГУ.

Визуализация электрофореграмм белков плероцеркоидов и взрослых особей *T. nodulosus* и *T. crassus* и статистическая обработка данных. После электрофоретического разделения проводили визуализацию электрофореграмм с помощью лазерного сканера Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) с разрешением 100 мкм на пиксель. Анализ полученных изображений разных гелей и количественная оценка содержания белка была проведена в специализированном программном обеспечении (SameSpots, TotalLab) со встроенным специализированным протоколом статистического анализа, разработанного именно для метода DIGE. Сравнительный анализ включает в себя несколько последовательных этапов: выбор референсного изображения, выравнивание всех электрофореграмм относительно референсного изображения, выделение областей на геле, содержащих белковые пятна, выбор дизайна анализа и статистический анализ. С помощью алгоритма автоматического распознавания на геле выделяли зоны, содержащие отдельные белковые пятна. Для каждой выделенной зоны был проведен статистический анализ оптической плотности, в зависимости от принадлежности к той или иной группе биологических образцов. Различия считали достоверными только при выполнении двух условий: $p\text{-value} \leq 0.05$ и $\text{fold} \geq 2$, где $p\text{-value}$ — это уровень значимости, а значение fold показывает, во сколько раз различаются максимальное и минимальное средние нормализованные объемы (интенсивность окраски и занимаемая пятном площадь) сравниваемых белковых пятен. Работа была выполнена на базе Ресурсного Центра Методов анализа состава вещества Научного парка СПбГУ.

Идентификация белков плероцеркоидов и взрослых особей *T. crassus* и *T. nodulosus* методом отпечатка пептидных масс. Для визуализации полученных электрофореграмм гели после сканирования окрашивали спиртовым раствором Куммаса G-250 (Диаэм). Гидролиз белков проводили в полиакриламидном геле. Из гелей вырезали кусочки размером 2×2 мм, содержащие белковое пятно, дважды промывали их в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0.1M NH_4HCO_3 в течение 20 минут при комнатной температуре, удаляли раствор для дегидратации и к кусочкам геля вносили по 100 мкл ацетонитрила [115]. Затем удаляли ацетонитрил, высушивали кусочки геля, добавляли к ним 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0.05 M NH_4HCO_3 с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 18 часов при 37°C, затем к раствору добавляли 7 мкл 0.5% трифторуксусной кислоты

(ТФУ) в 10% растворе ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали [115]. Для следующего этапа анализа использовали надгелевый раствор. На мишени смешивали по 0.5 мкл раствора образца и раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Aldrich, 20 мг/мл в 20% ацетонитриле в воде с 0.5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе. Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенный УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.007% (70 ppm). Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводился в базе данных NCBI среди белков всех организмов с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом. Масс-спектрометрический анализ был проведен на базе ЦКП ФГБУ науки Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук.

Идентификация белков плероцеркоидов и взрослых особей *T. crassus* и *T. nodulosus* методом тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Для визуализации полученных электрофореграмм гели после сканирования окрашивали спиртовым раствором Куммаса G-250 (Диаэм). Фрагменты геля, содержащие целевые белки, вырезали и измельчали скальпелем. Для вымывания красителя и SDS фрагменты геля трижды промывали раствором 30 мМ Трис (Sigma), pH 8.2 в 50% ацетонитриле (LC-MS grade, LiChrosolv) в течение 15 минут при комнатной температуре и постоянном помешивании [115]. Затем фрагменты геля регидратировали 100% ацетонитрилом. После удаления ацетонитрила пробы высушивали на воздухе в течение 10 минут. Для трипсинолиза белков проводили регидратацию кусочка геля в растворе трипсина (pH 8.2, 20 нг/мкл трипсина (Sigma), 30 мМ Трис) на льду в течение 1 часа, избыток раствора трипсина удаляли и вносили 45 мкл буфера для трипсинолиза (pH 8.2, 30 мМ Трис). Трипсинолиз проводили в течение 1 часа при 56°C или в течение ночи при 37°C. Триптические пептиды экстрагировали из геля 50% ацетонитрилом, подкисленным 0.1% муравьиной кислотой (Sigma) [115]. Полученный раствор высушивали в вакуумном концентраторе CentriVar (Labronco) при 4°C и растворяли в фазе А для последующей хроматографии (5% ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота). Масс-спектрометрический анализ триптических пептидов осуществлялся с использованием квадруполь-времяпролетного масс-спектрометра Agilent ESI-Q-TOF 6538 UHD (Agilent Technologies), совмещенного с высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent 1260 (Agilent Technologies). Хроматографическое разделение проводили в системе вода-ацетонитрил в присутствии 0.1% муравьиной кислоты (фаза А – 5% ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота; фаза В – 90% ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота) в градиенте ацетонитрила (от 5% до 60% фазы В за 25

минут и до 100% фазы В за 5 минут) на колонке Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies; 3.5 мкм, внутренний диаметр 0.10 мм, длина 150 мм) со скоростью потока 15 мкл/мин. Анализ ионов проводили с частотой 3.3 спектра в секунду в режиме автоматического tandemного MS/MS-анализа с материнскими ионами 2+, 3+, n+. Анализ масс-спектрометрических данных и идентификацию белков проводили с использованием программного обеспечения Agilent Mass Hunter Software, Spectrum Mill MS Proteomic Workbench (Rev B.04.00.127; Agilent Technologies) и Mascot. Поиск проводился по полученной нами базе предсказанных белков *T. nodulosus* при секвенировании транскриптома и по последовательностям базы UniProtKB (<https://www.uniprot.org>), с фильтром по таксону «Eucestoda» и с учетом возможной ошибки определения массы материнских ионов не более 20 ppm. Оценка достоверности полученных данных осуществлялась с использованием процедуры автовалидации при пороговом значении отсечения ложноположительных результатов FDR (False discovery rate) в 1.2%. После идентификации пептидов, проверялось соответствие идентифицированного белка его реальному положению на геле. Работа была выполнена на базе Ресурсного Центра Методов анализа состава вещества Научного парка СПбГУ.

Функциональная аннотация идентифицированных белков плероцеркоидов и взрослых особей *T. crassus* и *T. nodulosus*. Для функциональной аннотации идентифицированных белков использовали сервис InterPro v.70.0 (European Bioinformatics Institute), встроенные биоинформатические алгоритмы программ FunctionAnnotator [71], Blast2GO [94], QuickGO [54].

2.4 Анализ белкового состава плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных видов вторых промежуточных хозяев

Сбор материала. Плероцеркоиды *T. nodulosus* из различных видов вторых промежуточных хозяев были собраны в 2015 и 2016 году из рыб, выловленных в Ладожском (окунь *Perca fluviatilis* L., ерш *Gymnocephalus cernuus* L.) и Онежском озерах (налим *Lota lota* L.). Плероцеркоидов гельминта извлекали из цист, расположенных в печени рыб. Червей промывали в физиологическом растворе Тироде (0.800% NaCl, 0.020% KCl, 0.020% CaCl₂, 0.010% NaHCO₃, 0.010% MgCl₂, 0.005% NaH₂PO₄, 0.100% глюкоза) и осматривали под микроскопом. Живых паразитов с хорошо различимым сколексом отбирали и фиксировали в жидком азоте, где хранили до дня анализа.

Выделение и очистка водорастворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus*.

Замороженных плероцеркоидов растирали пестиком в ступке в жидком азоте до состояния порошка с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (1% от общего объема) (Protease inhibitor cocktail, Amresco) и 20%-го раствора PMSF (фенилметан сульфонилфторид) (Sigma). Содержание белка в пробах определяли по методу Бредфорда [60]. Для дальнейшего анализа отбирали объем гомогената, содержащий 0.4-0.45 мг белка. Белок из гомогената осаждали трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация - 10%). После осадок промывали ледяным 80% этанолом и двумя объемами охлажденного 100% ацетона. Пробы высушивали в ламинарном шкафу и хранили до анализа при -80°C .

Электрофоретическое разделение белков плероцеркоидов *T. nodulosus* в полиакриламидном геле (ПААГ). Образцы, содержащие очищенный белок, растворяли в буфере, содержащем 8 М мочевины, 2% Triton X-100, 0.05 М дитиотриетол, 0.5% амфолиты с диапазоном pH 3.5-10 (BioRad) [170] с добавлением коктейля ингибиторов протеаз (Abcam) и фенилметан сульфонилфторида (до конечных концентраций в растворе 1%). Затем образцы вносили в стеклянные капилляры, заполненные 3.84% полиакриламидным гелем с добавлением смеси амфолитов с диапазоном pH 3-10 и 5-7 (BioRad). Изоэлектрофокусирование проводили при помощи модифицированной системы BioRad Protean II Xi cell в течение 18 часов, постепенно повышая силу тока от 100 до 900 мА. После гели извлекали из капилляров и инкубировали в растворе Лэммли (9% додецилсульфат натрия (SDS), 6% β -меркаптоэтанол (объем/объем), 10% глицерин (объем/объем) с добавлением 2-5 мг бромфенолового синего в 0.196 М Трис-HCl (pH 6.7)). Гели, полученные после изофокусирования, накладывали на 10% ПААГ-гели и проводили денатурирующий электрофорез по Лэммли [137] в ячейке системы BioRad Protean II Xi cell с охлаждением. После проведения электрофореза гели были окрашены в течение 30 минут в растворе 0.2% Кумасси G-250 в 25% изопропанол и 10% уксусной кислоте. Затем гели отмывали в 25% изопропанол и 10% уксусной кислоте 2 раза по 30 минут и помещали в дистиллированную воду на ночь. Окрашенные гели фотографировали при помощи системы гель-документации MiniLumi (Berthold Technologies). Работа выполнена на базе лаборатории «Проблемы адаптации биосистем» НИИ биологии ИГУ.

Статистическая обработка данных. Для количественного анализа белковых профилей плероцеркоидов *T. nodulosus* проводили сравнение оптических плотностей белковых пятен на двумерных электрофореграммах. Сравнительный анализ полученных белковых паттернов выполняли с помощью пользовательского расширения для программы обработки изображений ImageJ Software. Выборка для анализа содержала по три электрофореграммы для каждого из трех видов промежуточного хозяина плероцеркоидов *T. nodulosus*. Статистическую обработку данных проводили с использованием параметрической статистики t-тест ($p\text{-value} \leq 0.05$).

Идентификация белков плероцеркоидов *T. nodulosus* методом отпечатка пептидных масс. Для визуализации полученных электрофореграмм гели после сканирования окрашивали спиртовым раствором Куммаса G-250 (Диаэм). Гидролиз белков проводили в полиакриламидном геле. Из гелей вырезали кусочки размером 2×2 мм, содержащие белковое пятно, дважды промывали их в 100 мкл 40% раствора ацетонитрила в 0.1М NH₄HCO₃ в течение 20 минут при комнатной температуре, удаляли раствор для дегидратации и к кусочкам геля вносили по 100 мкл ацетонитрила [115]. Затем удаляли ацетонитрил, высушивали кусочки геля, добавляли к ним 4 мкл раствора модифицированного трипсина (Promega) в 0.05 М NH₄HCO₃ с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 18 часов при 37°C, затем к раствору добавляли 7 мкл 0.5% трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 10% растворе ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали [115]. Для следующего этапа анализа использовали надгелевый раствор. На мишени смешивали по 0.5 мкл раствора образца и раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Aldrich, 20 мг/мл в 20% ацетонитриле в воде с 0.5% ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе. Масс-спектры были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенный УФ-лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.007% (70 ppm). Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot (www.matrixscience.com). Поиск проводился в базе данных NCBI среди белков всех организмов с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом. Масс-спектрометрический анализ был проведен на базе ЦКП ФГБУ науки Лимнологического института Сибирского отделения Российской академии наук.

2.5 Изучение вариабельности состава протеома *S. solidus* при переходе от стадии плероцеркоида к половозрелому гельминту

Сбор материала. Зараженные особи трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. были выловлены летом 2019 года в оз. Машинное (Республика Карелия, Лоухский район, пос. Чкаловский) с помощью сачка. Зараженных особей колюшки при отлове отличали от незараженных рыб по сильно раздутому брюшку и нетипичным движениям при плавании. До момента проведения эксперимента рыба содержалась без кормления в аквариумах с аэрацией и при температуре воды 20-22°C.

Инкубация инвазионных плероцеркоидов *S. solidus* при 40°C в течение 48 часов (получение половозрелых гельминтов). Перед началом инкубации зараженных особей колюшки умерщвляли, разрушая головной мозг с помощью тонкой препаровальной иглы. Гельминтов извлекали из полости тела рыб и два раза промывали в растворе, содержащем среду RPMI-1640 с L-глутамином и бикарбонатом натрия (Sigma-Aldrich) и 1% антибиотика-антимикотика (Sigma-Aldrich). Затем червей помещали в культуральные флаконы со средой RPMI-1640 с добавлением 0.5% антибиотика-антимикотика и 10% глюкозы и инкубировали при концентрации CO₂ 5-10%, температуре 40°C (5 образцов) и 17-20°C (5 образцов) в течении 48 часов, ежедневно меняя среду (Таблица 1). Половозрелость цестод определяли по наличию в среде яиц. По окончании 48 часов инкубации червей извлекали из культуральных флаконов, промывали в физиологическом растворе и фиксировали в жидком азоте, где хранили до анализа.

Таблица 1 - Описание образцов плероцеркоидов *S. solidus*.

№ образца	Условия эксперимента	Вес червя до инкубации, г	Вес червя после инкубации, г	Интенсивность заражения колюшки, из которой были собраны плероцеркоиды
15	22°C, 48 ч	0.34	0.23	1
16	22°C, 48 ч	0.10	0.07	1
18	22°C, 48 ч	0.26	0.18	1
21	22°C, 48 ч	0.13	0.06	1
22	22°C, 48 ч	0.19	0.12	1
30	40°C, 48 ч	0.13	0.11	1
31	40°C, 48 ч	0.28	0.23	1
32	40°C, 48 ч	0.35	0.29	1
33	40°C, 48 ч	0.11	0.09	1
36	40°C, 48 ч	0.12	0.09	1

Выделение и очистка водорастворимых белков *S. solidus*. Замороженных особей *S. solidus* растирали пестиком в ступке с жидким азотом с добавлением 1 % коктейля ингибиторов протеаз (Protease inhibitor cocktail, Amresco) и 20 %-го раствора фенилметан сульфонилфторида (Sigma) до состояния порошка. Содержание белка в пробе определяли по методу Бредфорда [60]. Для дальнейшего анализа отбирали объем гомогената, содержащий 0.4-0.45 мг белка.

Белок из гомогената осаждали трихлоруксусной кислотой (конечная концентрация в растворе - 10%). После осадок промывали ледяным 80 % этанолом и двумя объемами охлажденного 100% ацетона. Пробы высушивали в ламинарном шкафу и хранили до анализа при -80°C.

Идентификация белков *S. solidus* методом тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). К белковым экстрактам гельминтов *S. solidus* вносили по 500 мкл буфера pH 8.5 (1% SDS, 50 mM триэтиламмония бикарбоната (ТЭАБ)), затем образцы обрабатывали ультразвуком (с мощностью 30%) в течение 1 минуты на соникаторе Bandelin Sonopuls (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Германия), центрифугировали при 14000 g и 20°C. Отбирали супернатанты и измеряли в них концентрацию общего белка колориметрическим методом с бичинхониновой кислотой (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 562 нм в 3-кратной повторности [205]. Для калибровки концентрации белка использовали стандартные растворы альбумина.

С целью восстановления и алкилирования дисульфидных связей белков в образцы инкубировали в растворе 4 mM трис(2-карбок시에тил)фосфина (ТСЕР) и 6.2 mM 2-хлорацетамида (САА) при температуре 80°C в течение 40 мин. После чего полученную смесь переносили в концентрирующие фильтры Microcon devices YM-10 и центрифугировали при 11000 g 15 минут при 20°C. Затем пробы промывали 6 раз центрифугированием при 11000 g 15 мин при 20° C, добавляя каждый раз по 200 мкл буфера pH 8.5 (8 M мочевины в 50 mM ТЭАБ). По завершению последнего этапа промывки к образцам добавляли по 100 мкл буфера pH 8.5 (50 mM ТЭАБ), содержащего трипсин (Promega) в соотношении фермент/общая масса белка =1/100, и оставляли смесь на ночь при 37°C и при постоянном перемешивании со скоростью 350 об/мин. Для получения смеси пептидов пробы центрифугировали при 11000 g в течение 15 мин при 20°C, после фильтры промывали 50 мкл 30%-раствором муравьиной кислоты при центрифугировании при 11000 g в течение 15 мин при 20°C. Полученные фильтраты высушивали в вакуумном концентраторе и растворяли в 20 мкл 5% муравьиной кислоты [97].

Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографической системы (ВЭЖХ) Ultimate 3000 RSLCnano («Thermo Scientific») в градиентном режиме элюирования с колонкой Acclaim Pepmap® C18 (75 мкм x 150 мм, размер частиц 2 мкм) («Thermo Scientific»). Подвижная фаза А с pH 2.66 содержала 0.02% уксусной кислоты (Merck, Германия) и 0.1% муравьиной кислоты (Acros Organics, Германия). Состав подвижной фазы Б включал 80% ацетонитрил (Fisher Scientific, Великобритания), 0.02% уксусной кислоты, 0.1% муравьиной кислоты. Скорость подвижной фазы составляла 0.3 мкл/мин. Перед аналитическим разделением пептиды наносили на обогащающую колонку Acclaim μ -Precolumn (0.3 мм x 5 мм, размер частиц 5 мкм) (Thermo

Scientific, США, № лота 160454) при скорости потока 10 мкл/мин в течение 5 минут в изократическом режиме подвижной фазы В (2% ацетонитрил, 0.02% уксусная кислота, 0.1% муравьиная кислота, рН = 2.63).

Идентификация белков проводилась на гибридном орбитальном масс-спектрометре Orbitrap Q-Exactive HF-X (Thermo Scientific™ Q Exactive™ HF-X Hybrid Quadrupole-Orbitrap™, Rockwell, IL, USA) в режиме положительной ионизации в источнике NSI («Thermo Scientific», США). Температура осушающего газа (азот) составляла 280° С, напряжение на эмиттере 2.1 кВ. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 400 m/z до 1200 m/z, тандемное сканирование фрагментных ионов от нижней границы 110 m/z до верхней границы, определяемой зарядным состоянием прекурсорного иона, но не более 2100 m/z. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от $z = 2+$ до $z = 6+$ по зарядному состоянию. Максимальное число разрешённых для синхронной изоляции ионов в режиме MS2 - не более 20, максимальное время накопления для прекурсорных ионов - не более 50 мс, а для фрагментных ионов - не более 110 мс. Масс-спектрометрический анализ образцов был проведен на базе ЦКП «Протеом человека» Института биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича.

Обработка и идентификация белков проводилась с использованием программы SearchGUI v.3.3.7 с поисковым алгоритмом X!Tandem по базе данных UniprotKB с ограничением по виду организма – *Schistocephalus solidus*. Для поиска были установлены следующие параметры: расщепляющий фермент - трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов (MS) ± 5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS ± 0.01 Да и возможность пропуска одного сайта расщепления, возможная модификация пептидов - окисление метионинов, фиксированная модификация - карбамидометилирование цистеинов, величина FDR (false discovery rate) для валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSMs (peptide-spectrum matches) - не более 1.0%, оценка количественного содержания белков - LFQ (Label-free quantification) [230]. Белки считались достоверно идентифицированными, если для них было обнаружено как минимум два пептида, удовлетворяющих критериям валидации. Для визуализации полученных результатов поиска использовали программу PeptideShaker v.1.16.34 [229].

Статистическая обработка данных. Сравнительный анализ белковых профилей белков особей *S. solidus* опытной и контрольной групп осуществляли по показателю «Spectral count» (общее количество спектров идентифицированного белка [153] с использованием пакета ROTS (Reproducibility-Optimized Test Statistic) для программы R (R Core Team), который оптимизирует выбор среди семейства модифицированных t-статистик [218]. Перед анализом LFQ-интенсивность спектров была нормализована с помощью функции normalizeVSN в пакете «limma» для программы R (R Core Team) [189].

Функциональная аннотация идентифицированных белков *S. solidus*. Для функциональной аннотации идентифицированных белков *S. solidus* использовали сервис InterPro v.70.0 (European Bioinformatics Institute), встроенные биоинформатические алгоритмы программ FunctionAnnotator [71], Blast2GO [94], QuickGO [54].

2.6 Изучение паразито-хозяйинных отношений *S. solidus* и трехиглой колюшки *G. aculeatus*: анализ белкового состава смывов с покровов тела плероцеркоидов и целомической полости рыб

Описание эксперимента. Зараженные и незараженные особи трехиглой колюшки *G. aculeatus* были выловлены в конце июня 2020 года в озере Машинное (Республика Карелия, Лоухский р-н, пос. Чкаловский). Зараженные особи колюшки были выловлены с использованием сачка, а незараженные – с помощью живоловки. До лаборатории живая рыба была доставлена в бочках (50 литров) с водой и постоянной аэрацией. Образцы смывов полости тела рыб были собраны не позднее двух суток с момента вылова рыб.

В день эксперимента рыб длиной 50-57 мм умерщвляли тонкой иглой, разрушая головной мозг. Протирали спиртом кожу на брюшке рыбы и вскрывали в стерильных условиях, начиная со стороны головы, не доходя до анального отверстия 2-3 мм. Доставали всех червей из полости тела рыб, взвешивали, помещали в 1.5 мл пробирку с 500 мкл буфера PBS pH 7.4 с 1% коктейля ингибиторов протеаз (Protease inhibitor cocktail, Amresco), промывали червей в данном растворе в течение 30 секунд - 1 минуты. Одновременно, новую порцию буфера с коктейлем ингибиторов протеаз равную 100 мкл вводили в полость тела вскрытой рыбы, осторожно промывали пипетированием и собирали той же пипеткой. Процедуру повторяли 3 раза. Смывы полости тела рыбы объединяли со смывами с поверхности гельминта. Для эксперимента отбирали особей рыб, которые содержали хотя бы одного гельминта с весом от 50 мг (инвазионный плероцеркоид). В качестве контроля использовали смывы полости тела незараженных паразитом *S. solidus* рыб. Далее все образцы центрифугировали при 400 g 7 минут при температуре 4°C на центрифуге Beckman Coulter Allegra 64R centrifuge (Beckman Coulter, Inc., USA) для осаждения клеток крови и экссудата полости тела рыб. Отобранные супернатанты замораживали в жидком азоте и высушивали в лиофильной сушке FreeZone (Labconco, USA). Высушенные образцы хранили при -80°C до проведения масс-спектрометрического анализа. После процедуры отбора смывов был проведено определение

пола и возраста *G. aculeatus* по отолитам сотрудником Лаборатории экологии рыб и водных беспозвоночных ИБ КарНЦ РАН.

Идентификация белков в смывах с поверхности тела *S. solidus* и целомической полости трехиглой колюшки методом тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Контрольная и опытная группы включали по 4 образца смывов. Выборки по возможности были сбалансированы по возрасту и полу рыб (Таблица 2). Некоторые образцы, а именно образцы из контрольной группы, во время пробоподготовки были объединены с целью получить концентрацию белка достаточную для масс-спектрометрического анализа (0.5-1.0 мкг/мкл). Лиофилизированные образцы растворяли в 300 мкл буфера pH 8.5, содержащего 50 мМ ТЭАБ. Далее смывы промывали 50 мМ бикарбонатом аммония и концентрировали до конечного объема 100 мкл с помощью фильтров Microcon devices YM-10. Концентрацию общего белка в образцах измеряли колориметрическим методом с бидинхониновой кислотой (BCA) (Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) при длине волны 562 нм в 3-кратной повторности [205]. В качестве стандарта использовали водный раствор бычьего сывороточного альбумина.

Для восстановления и алкилирования дисульфидных связей образцы доводили до объема 50 мкл буфером pH 8.5 (50 мМ ТЭАБ), инкубировали 30 минут в смеси 4 мМ ТСЕР и 6.2 мМ САА при 80°C. Для гидролиза белков к образцам добавляли трипсин (Promega) (в соотношении фермента/общая масса белка = 1/50) и инкубировали их в течение ночи при 37°C при встряхивании 350 об/мин. Реакцию останавливали раствором 30% муравьиной кислоты, по 5 мкл в каждый образец [97]. Образцы центрифугировали при 11000 g в течение 15 минут в термостатируемой центрифуге при температуре 20°C. Фильтрат высушивали в вакуумном концентраторе и растворяли в 20 мкл 5% муравьиной кислоты для последующего масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ пептидов проводили с использованием ВЭЖХ системы Ultimate 3000 RSLCnano («Thermo Scientific», США), соединенной с масс-спектрометром Q-exactive HFX («Thermo Scientific», США). На колонке Acclaim Pepmap® C18 (75 мкм x 150 мм, 2 мкм размер частиц) («Thermo Scientific», США) в градиентном режиме элюирования проводили разделение 1 мкг образца при скорости потока 0.3 мкл/мин (подвижная фаза А - 0.1% муравьиная кислота, подвижная фаза Б - 80% ацетонитрил, 0.1% водный раствор муравьиной кислоты). Общая длительность анализа составляла 90 минут.

Идентификация белков была проведена на масс-спектрометре Q-exactive HFX в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI («Thermo Scientific», США) с напряжением на эмиттере 2.1 кВ и температурой капилляра 240°C. Панорамное сканирование

проводили в диапазоне масс от 300 m/z до 1500 m/z, при разрешении 120000, а тандемное сканирование – при разрешении 15000 в диапазоне масс от 100 m/z до верхней границы, определяемой автоматически исходя из массы прекурсора. Изоляция прекурсорных ионов проводилась в окне ± 1 Да. Максимальное число разрешенных для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено как не более 25, граница отсечения для выбора прекурсора для тандемного анализа - 80000 единиц, нормализованная энергия соударения - 29. При тандемном сканировании учитывали ионы с зарядом от 2+ до 5+. Максимальное время накопления для прекурсорных ионов составило 50 мс, для фрагментных ионов 100 мс. Все измеренные прекурсоры динамически исключались из тандемного MS/MS анализа на 70 с. Масс-спектрометрический анализ образцов был проведен на базе ЦКП “Протеом человека” Института биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича.

Таблица 2 - Описание образцов смывов с поверхности тела *S. solidus* и целомической полости колюшки трехиглой *G. aculeatus*.

№ рыбы	Пол рыбы	Возраст рыбы, лет	Зараженность рыб (количество червей)	№ образца в анализе	Концентрация белка, мкг/мкл
Незараженные рыбы					
12	Самка	2	0	1	0.89
15	Самка	2	0	2	0.39
17	Самка	2	0		0.22
13	Самка	2	0	3	0.28
18	Самка	1	0		0.27
14	Самка	2	0	4	0.29
16	Самец	2	0		0.24
Зараженные рыбы					
19	Самка	1	1	6	0.63
20	Самка	2	4	7	0.64
24	Самка	2	1	8	0.55
25	Самка	2	5	5	0.77

Полученные в результате масс-спектрометрического анализа файлы в raw-формате были загружены в программу MaxQuant v.1.6.4.3 [78]. Идентификация белков проведена по алгоритму Andromeda, встроенному в MaxQuant, по базе данных UniProtKB/Swiss-Prot с фильтром по таксонам *Schistocephalus solidus* (доступ к базе в мае 2020 года; 43048 записей последовательностей) и *Gasterosteus aculeatus* (доступ к базе в мае 2020 года; 29065 записей последовательностей). Для поиска были заданы следующие параметры: расщепляющий фермент - трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ± 5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS ± 0.01 Да, возможность пропуска двух сайтов расщепления; возможные модификация пептидов - окисление метионинов, N-концевое ацетилирование, обязательная модификация - модификация цистеина йодацетоамидом, значение FDR при валидации сопоставлений спектров и пептидов, идентификации пептидов - не более 1.0%, оценка количественного содержания белков - LFQ [78].

Статистическая обработка данных. Матрица данных, полученная в результате анализа спектров в MaxQuant, была загружена в программу Perseus ver. 1.6.2.3 [225], где в которой была проведена фильтрация данных с исключением контаминаций, белков, идентифицированных по модифицированным и инвертированным пептидами, и белков, имеющих менее двух уникальных пептидов. После проведена процедура заполнения пропущенных значений (imputation missing values) в наборе данных, которой включал белки, имеющие значения LFQ-интенсивности для двух или более технических повторов и трех или более биологических повторов [226]. Заполнение отсутствующих значений было выполнено с использованием метода «brca» (пакет «PCAMethod» для программы R (R Core Team) [215]. Сравнение количественного содержания белков в смывах с полости тела рыб контрольной и опытной групп проводили с помощью модифицированного t-теста с использованием эмпирической байесовской статистики для вычисления ожидаемой дисперсии малой выборки (пакет «limma» для программы RStudio [189]). Значения LFQ-интенсивности белков предварительно были скорректированы и нормализованы с помощью функции «normalizeVSN».

Функциональная аннотация идентифицированных белков *S. solidus* и колюшки *G. aculeatus*. Функциональная аннотация белков, идентифицированных в смывах с поверхности покровов тела гельминта *S. solidus* и полости тела трехиглой колюшки *G. aculeatus* с использованием сервисов и программ InterPro v.70.0 (European Bioinformatics Institute), FunctionAnnotator [72], Blast2GO [94], QuickGO [54].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Изучение белкового состава цестод *Triaenophorus* spp.

3.1.1. Первые данные о составе транскриптома *T. nodulosus*

Использование протеомных методов требует наличия базы данных аминокислотных последовательностей изучаемого вида организма. Поскольку для рода *Triaenophorus* spp. такая информация отсутствовала, нами была проведено секвенирование транскриптома цестоды *T. nodulosus* [128]. На основе полученной нуклеотидной базы были сгенерированы 37 780 предполагаемых аминокислотных последовательностей *T. nodulosus*, которые в дальнейшем использовались нами для идентификации белков гельминтов *Triaenophorus* spp.

Предсказанный протеом также позволил нам рассмотреть исследуемый вид паразита в филогенетическом контексте. На основе предсказанных белков *T. nodulosus* и других доступных видов цестод [141] построено древо гомологичных последовательностей (Рисунок 1), которое в целом совпало с результатами предыдущих филогенетических исследований [237]. Протеом *T. nodulosus* занял обособленное место на полученном филогенетическом древе, как единственный на данный момент представитель семейства Bothriosephalidea, для которого была получена база данных белковых последовательностей. Более половины белков *T. nodulosus* не имели гомологов в протеомах других видов цестод. Из них 66% белков содержали известные консервативные домены, а остальные имели уникальную структуру (на момент анализа). Поиск гомологов предсказанных белков *T. nodulosus* в кластерах генов паразитических червей из полномасштабного исследования Международного консорциума по изучению геномов гельминтов [160] выявил, что в транскриптоме *T. nodulosus* были обнаружены продукты 97% семейств генов специфичных для типа Плоские черви и 82% генов специфичных для ленточных червей. Кроме того, в транскриптоме *T. nodulosus* были обнаружены некоторые последовательности, ранее отнесенные к специфичным для отрядов Diphyllbothriidea и Cyclophyllidea, а также класса Trematoda.

В целом, среди экспрессируемых *T. nodulosus* белков было обнаружено много таксон-специфичных форм белков цитоскелета и клеточной адгезии (профилин, спектрин, кальпонин, катенин, кадгерин, интегрин, динеин, тубулин и другие), что указывает на их специфическую субклеточную организацию. В транскриптоме *T. nodulosus* наблюдалась характерная для гельминтов сверхпредставленность тетраспанинов, которые участвуют в секреции различных

иммуномодулирующих молекул. Среди белков, способствующих выживанию паразита в организме хозяина и участвующих в активной инвазии и питании, в транскриптоме *T. nodulosus* были обнаружены различные молекулярные шапероны (HSP20, HSP40, HSP70, HSP90, главный антиген яиц р40, эндоплазмин, иммуофилин и другие.), протеолитические ферменты (аминопептидазы, кальпаины, катепсины, металлопептидазы, сериновая протеиназа и другие), ингибиторы протеиназ (kunitz-подобный ингибитор протеаз, ингибитор сериновой протеазы и серпин) и антиоксидантные ферменты (глутатион S-трансферазы, супероксиддисмутаза, глутаредоксины, тиоредоксины, тиоредоксинглутатионредуктазы, тиоредоксинпероксидазы и т.д.).

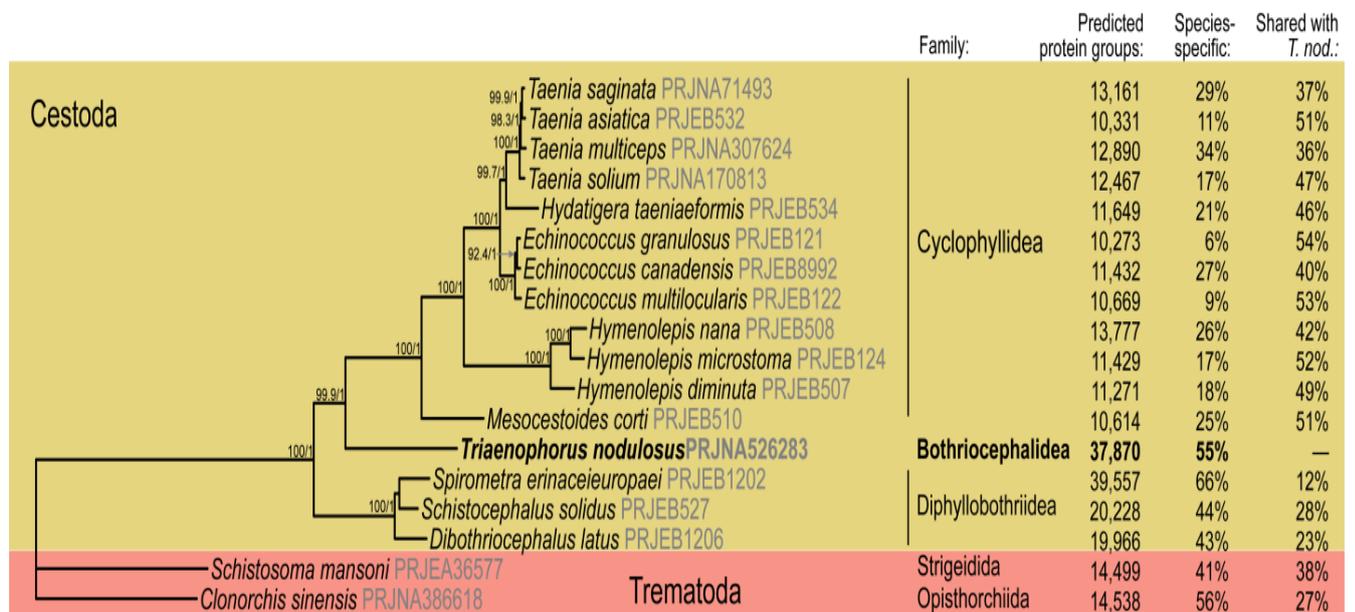


Рисунок 1 - Филогенетическое древо цестод на основе белковых последовательностей 70 ортологов.

Таким образом, описание транскриптома *T. nodulosus* позволило уточнить эволюционную историю становления ленточных червей как облигатных эндопаразитов на молекулярном уровне. Также была выявлена большая группа белков с уникальной структурой, потенциально играющих важную роль в жизнедеятельности представителей семейства Bothriocerphalidae, представленного преимущественно паразитами рыб. Все необработанные полученные данные и последовательности были загружены в базу данных NCBI BioProject (номер доступа PRJNA526283). Необработанные чтения были загружены в базу данных NCBI SRA (SRX5509575), а собранные контиги - в базу данных Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) под номером доступа GHIF00000000. Опубликованные по результатам исследования базы данных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей, функциональные аннотации белков *T. nodulosus* могут существенно облегчить биохимические и протеомные исследования данных цестод.

3.1.2. Сравнительный анализ белкового состава различных отделов тела плероцеркоидов и взрослых особей *T. nodulosus* и *T. crassus*

Тело гельминтов *T. nodulosus* и *T. crassus*, как и многих представителей класса Ленточные черви, функционально и биохимически дифференцировано в продольном направлении. Головной сегмент плероцеркоидов и взрослых особей *Triaenophorus* spp. (сколекс) несет органы прикрепления (две пары крючьев и две псевдотриии), с помощью которых паразит удерживается на стенках кишечника окончательного хозяина. Шейный отдел тела цестод является зоной роста, где образуются новые проглоттиды. В процессе роста и развития в новых сегментах червя образуются системы органов. У взрослых червей происходит интенсивный рост стробилы, закладывается и формируется половая система, а также продуцируются яйца. С удалением от шейного отдела органы репродуктивной системы в проглоттидах стробилы взрослых червей постепенно созревают, а другие органы деградируют, на фоне снижения метаболической активности и накопления запасов питательных веществ [17]. В конце стробилы зрелых червей расположены gravidные проглоттиды, заполненные яйцами [201].

Изучен состав белков сколексов, незрелых проглоттид плероцеркоидов и взрослых *T. nodulosus* и *T. crassus*, а также зрелых проглоттид взрослых червей [58]. Было идентифицировано 11 белков среди тех, которые достоверно различались по содержанию в различных отделах тела цестод (Таблица 3, Приложение). Многомерный анализ интенсивности окраски белковых пятен на DIGE-электрофореграммах показал, что состав мажорных белков *Triaenophorus* spp. главным образом зависит от части тела червя, а затем от его вида (Рисунок 2А). Содержание белков, вариабельность количества которых вносит основной вклад в первую главную компоненту изменчивости, сильно коррелирует с расстоянием от сколекса паразита (Рисунок 2Б), что указывает на тенденцию постепенного изменения состава белков от головного к дистальному отделу стробилы червя.

У цестод *T. nodulosus* и *T. crassus* обнаружено значительное снижение содержания цитоскелетных и двигательных белков, таких как актин, парамиозин, регуляторная легкая цепь миозина и тропомиозин 2, в дистальных частях тела по сравнению со сколексами (Рисунок 2Б, 3). Идентифицированные структурные белки являются важными компонентами тегумента плоских червей [146], и их экспрессия отражает изменения морфо-анатомической структуры сегментов тела червей в процессе их роста и развития. Созревание проглоттид у цестод сопровождается атрофией основного органа выделения и всасывания питательных веществ тегумента [24, 51, 86, 95, 143]. В отличие от других структурных белков, содержание β -цепи

тубулина снижается по направлению к дистальному отделу стробилы у *T. nodulosus* и *T. crassus*. Было показано, что β - и α -цепь тубулина интенсивно накапливаются в яйцах *Schistosoma haematobium*, что позволяет предположить, что тубулин в зрелых проглоттидах *T. nodulosus* и *T. crassus* участвует в формировании яиц [245].

В зрелых проглоттидах цестод было повышено содержание бета-индуцированного фактора роста ig-h3 (TGFB1) относящегося к суперсемейству фасциклинов. У плоских червей эти белки образуют таксон-специфичную группу (белки гинекофорального канала) [37, 116]. TGFB1 связываются с белками цитоскелета (интегрином и актином) и участвуют в формировании межклеточных контактов. Известно, что цестоды, включая *T. nodulosus*, являются одними из немногих беспозвоночных, которые образуют контакты плацентарного типа между оплодотворенными яйцами и эпителием матки, для передачи питательных веществ от родительского организма к эмбрионам [18]. Синтез TGFB1 может быть молекулярной основой адгезии яйца и выростов маточного эпителия червя.

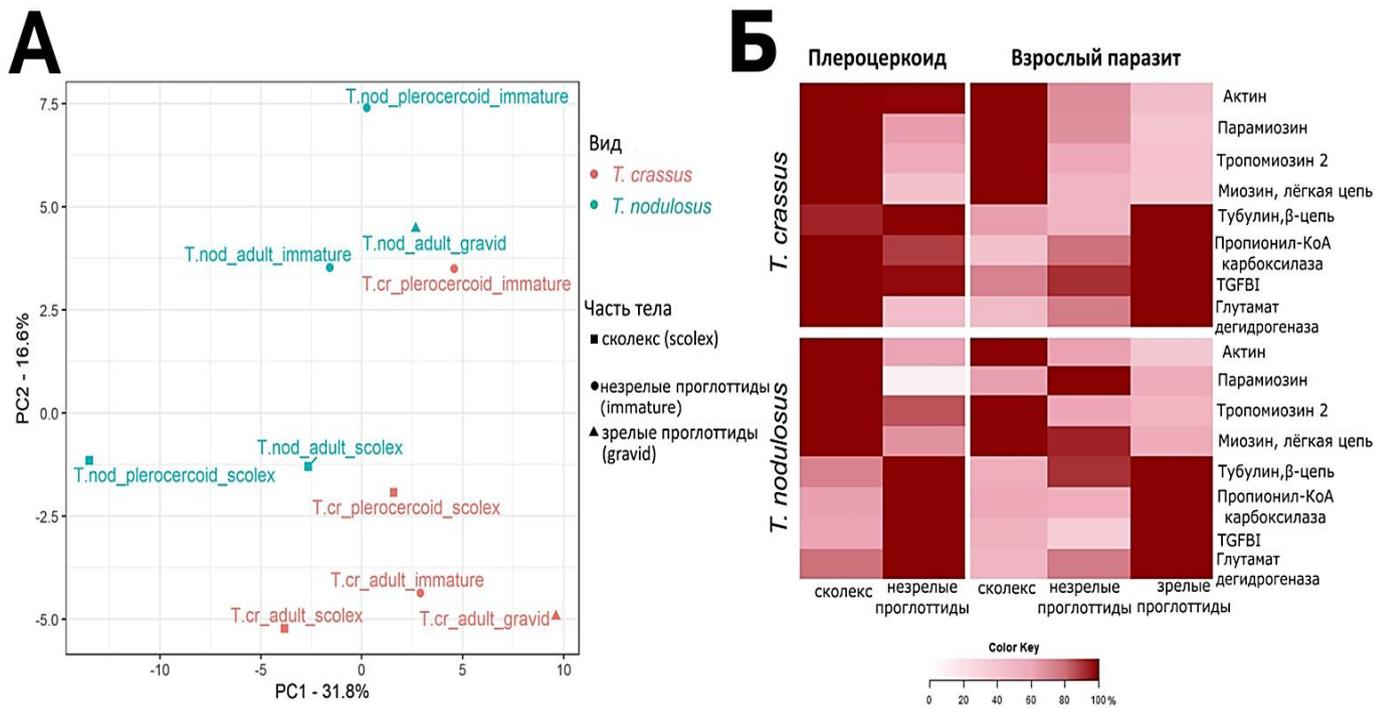


Рисунок 2 - Анализ интенсивности окраски белковых пятен на DIGE-электрофореграммах *T. nodulosus* и *T. crassus*. А – Результаты анализа методом главных компонент содержания белков *Triaenophorus* spp. Б – Тепловая карта содержания идентифицированных белков *T. nodulosus* и *T. crassus* (в % от самого высокого значения на конкретной жизненной стадии), содержание которых постепенно изменяется по мере удаления от сколекса.

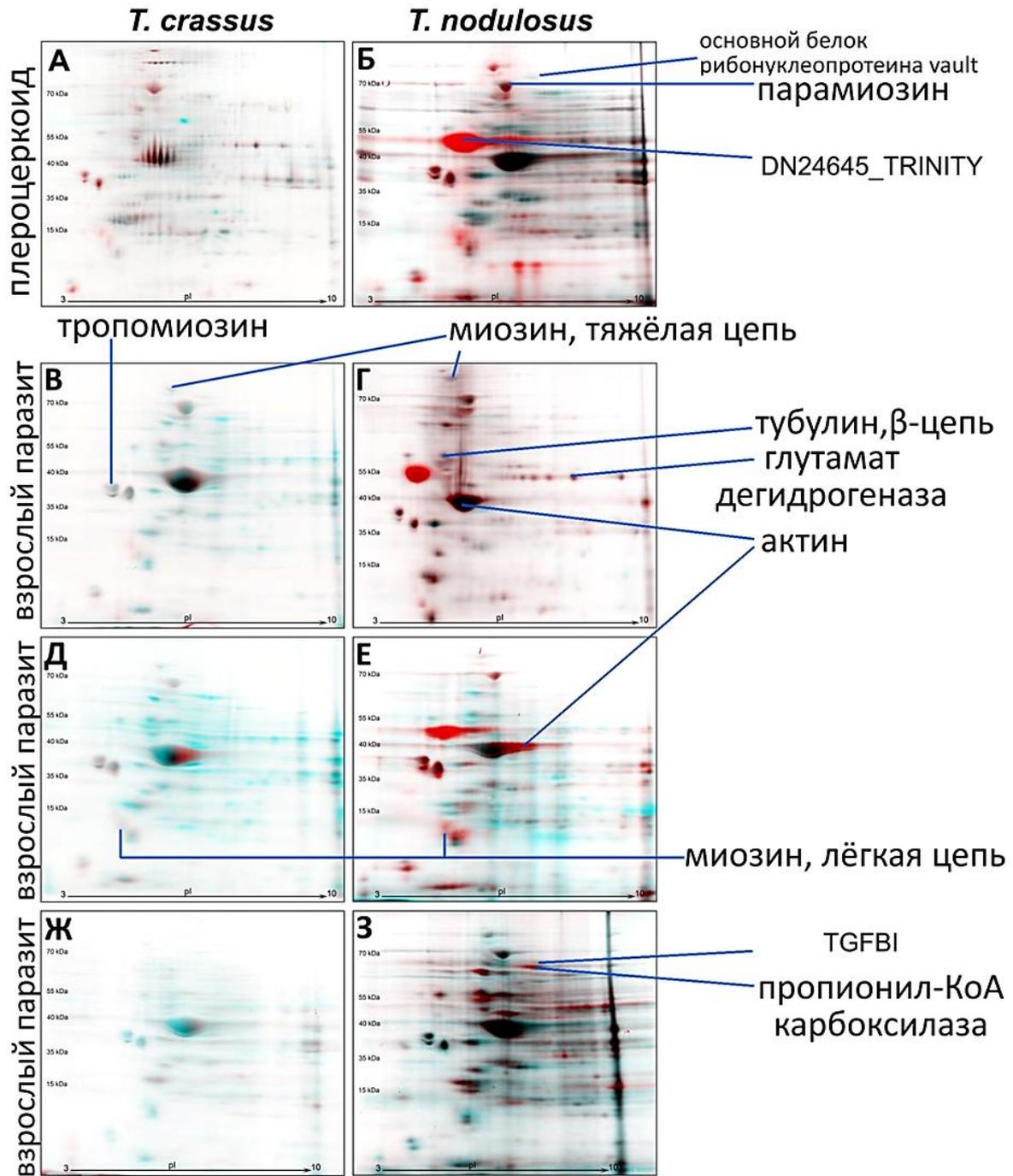


Рисунок 3 - Репрезентативные DIGE-электрофореграммы белков *T. crassus* и *T. nodulosus* после визуализации красителя и присвоения псевдоцветов. А - сколексы (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) плероцеркоидов *T. crassus*; Б – сколексы (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) плероцеркоидов *T. nodulosus*; В – сколексы (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. crassus*; Г – сколексы (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. nodulosus*; Д - сколексы (красный) и зрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. crassus*; Е – сколексы (красный) и зрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. nodulosus*; Ж – зрелые (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. crassus*; З – зрелые (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. nodulosus*.

Пропионил-КоА-карбоксилаза является еще одним белком, содержание которого было повышено в дистальных отделах стробилы *T. crassus* и *T. nodulosus* по сравнению с другими сегментами тела. У гельминтов этот фермент, возможно, участвует в выработке энергии при неполном расщеплении глюкозы в анаэробных условиях [181]. Однако анализ экспрессии данного белка у различных представителей плоских червей на разных стадиях жизненного цикла не позволяет сделать однозначные выводы о его значении в биологии цестод [87, 132, 223, 245].

Для того чтобы изучить молекулярные основы избирательности гельминтов по отношению к хозяину, нами была изучена видовая специфика набора экспрессируемых белков *T. nodulosus* и *T. crassus*. Оба вида обитают в одних и тех же водоемах и часто в одних и тех же видах хозяев. Жизненные циклы *T. nodulosus* и *T. crassus* различаются тем, что плероцеркоиды *T. nodulosus* паразитируют в печени рыб из широкого круга семейств (Salmonidae, Osmeridae, Esocidae, Cyprinidae, Cobitidae, Siluridae, Anguillidae, Gadidae, Percidae, Cottidae, Gasterosteidae, Gobiidae и др.), тогда как плероцеркоиды *T. crassus* поселяются только в мышцах рыб из семейств Salmonidae и Osmeridae [23]. Сравнительный анализ паттернов синтеза белков плероцеркоидов и зрелых особей *T. crassus* и *T. nodulosus* выявил различия для менее 2% белковых пятен на электрофореграммах гельминтов. Среди идентифицированных белков, по содержанию которых различаются белковые профили *T. nodulosus* и *T. crassus*, особое внимание обращает на себя неохарактеризованный белок DN24645_TRINITY. Не было выявлено гомологов данного белка у известных организмов, следовательно, данный белок специфичен для представителей Bothriosephalidea или даже для *T. nodulosus*. Количественное содержание белка DN24645_TRINITY в сколексах *T. nodulosus* было равным или даже выше, чем содержание актина, который является одним из мажорных белков в протеомах червей (Рисунок 3Б, 3Г, 3Е). При этом белок DN24645_TRINITY полностью отсутствует в сколексах и других частях тела у *T. crassus* (Рисунок 3А, 3Д).

Таким образом, несмотря на очень высокую концентрацию, данный белок, по-видимому, не является белком «домашнего хозяйства», необходимым для поддержания жизнедеятельности паразита. В первичной аминокислотной последовательности DN24645_TRINITY обнаружено наличие сигнального пептида, который обеспечивает транспорт этого белка из клетки. При этом содержание белка DN24645_TRINITY у *T. nodulosus* была значительно выше у плероцеркоидов по сравнению с взрослыми червями (Рисунок 4Б). Плероцеркоиды *T. nodulosus* паразитируют в печени рыб и обычно находятся в инцистированном состоянии, в отличие от плероцеркоидов *T. crassus*, которые свободно лежат в мускулатуре рыбы. Функция идентифицированного белка DN24645_TRINITY у *Triaenophorus* spp. возможно связана с защитными реакциями паразита против агрессивного воздействия окружающих его клеток

печени хозяина. Также между видами *T. crassus* и *T. nodulosus* отмечены различия по количественному содержанию структурных белков миозина и парамиозина, что, вероятно, отражает морфологические отличия двух видов (Рисунок 4) [23].

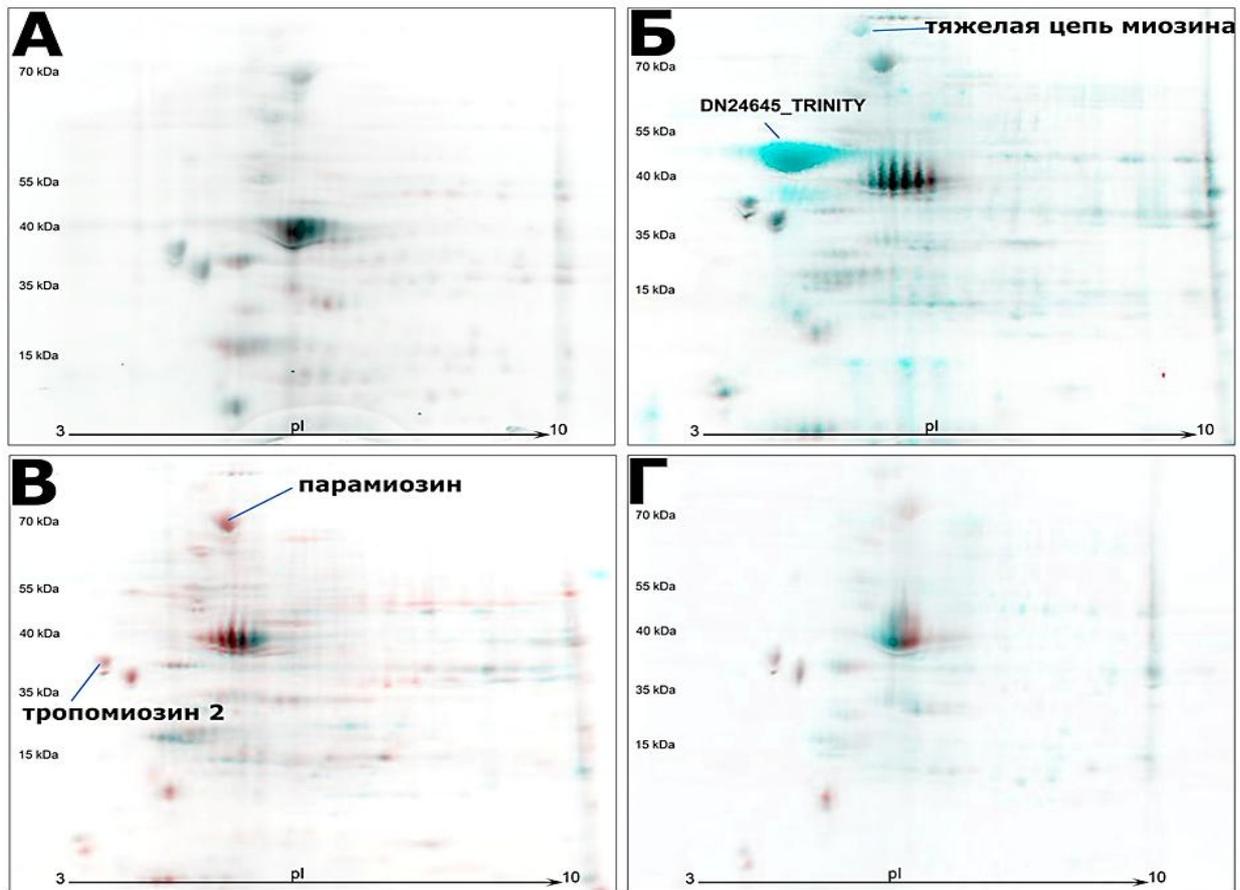


Рисунок 4 - Репрезентативные DIGE-электрофореграммы белков *T. crassus* и *T. nodulosus* после визуализации красителей и присвоения псевдоцветов. А – сколексы взрослых (красный) и плероцеркоидов (голубой) *T. crassus*; Б – сколексы взрослых (красный) и плероцеркоидов (голубой) *T. nodulosus*; В - незрелые проглоттиды взрослых (красный) и плероцеркоидов (голубой) *T. crassus*; Г – незрелые проглоттиды взрослых (красный) и плероцеркоидов (голубой) *T. nodulosus*.

3.1.3 Изучение белкового состава плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных видов вторых промежуточных хозяев

На различных фазах развития избирательность паразитических червей в отношении выбора хозяина может варьироваться [27]. Цестоды *T. nodulosus* на стадии процеркоида могут развиваться в организме более 19 видов планктонных рачков отрядов Cyclopoida и Calanoida, плероцеркоиды заражают рыб из 6 отрядов и 18 семейств (Percidae, Gadidae, Esocidae,

Salmonidae, Osmoridae, Thymallidae, Cottidae, Cyprinidae и др.), тогда как взрослые особи паразитируют исключительно в кишечнике щук *Esox spp.* [23, 133]. Несмотря на то, что хозяева паразита в конкретном периоде онтогенеза, обычно близки филогенетически и экологически, их внутренняя среда может существенно различаться и быть неодинаково благоприятной для развития гельминта. Эти вариации включают в себя различную интенсивность иммунного ответа хозяина на инвазию, метаболическую активность тканей хозяина [21] и химический состав внутренней среды (доступность питательных веществ, наличие регуляторных и сигнальных молекул). В результате, как показано в экспериментальных условиях, для одного и того же вида паразита характерен индивидуальный уровень эффективности инвазии разных видов хозяев [23]. В свою очередь, особи паразитов, заселившие различные виды, могут сильно отличаться друг от друга, вплоть до приобретения специфических морфологических признаков [1, 2, 3, 4, 8, 23]. Таким образом, полигостальность гельминтов демонстрирует высокий уровень приспособительной изменчивости вида, то есть подразумевает наличие у паразита способности к существенным физиологическим и биохимическим перестройкам при адаптации к среде обитания. В первую очередь подобные специфические изменения происходят на уровне белков, так как именно белки реализуют генетически заданные программы и под действием факторов среды формируют фенотип особей. Сравнительный анализ протеомов цестод в зависимости от условий среды обитания является перспективным подходом для объяснения различной патогенности паразитов и их неодинаковой способности заражать разные виды хозяев.

Проведен сравнительный анализ белковых профилей плероцеркоидов *T. nodulosus*, извлеченных из печени рыб различных видов - окуня *Perca fluviatilis* L., ерша *Gymnocephalus cernuus* L. и налима *Lota lota* L [20]. В пуле водорастворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus* на электрофореграммах выявлено около 170 белковых пятен. При сравнении белковых профилей червей разных видов рыб, статистически значимые различия по интенсивности окраски получены для 18 белковых пятен (Рисунок 5, 6), из которых с помощью масс-спектрометрических методов с высокой степенью достоверности удалось идентифицировать 5 белков. Далее для удобства в тексте идентифицированные белки обозначены согласно их названию, а неидентифицированные белки обозначены порядковым номером на суммарном геле.

Плероцеркоиды из трех видов рыб различались по содержанию белков микротрубочек - тубулинов (Рисунок 6, 7), а также по содержанию регуляторного G-белка (Рисунок 6, 7). Эти белки участвуют в сигнальном пути G-белковой регуляции цитоскелета и клеточной морфологии [199, 246], а вариации их содержания могут отражать морфологическую изменчивость гельминтов из разных хозяев на клеточном и тканевом уровне. Наибольшая концентрация тубулинов была отмечена у плероцеркоидов из окуня, а наименьшая – у червей *T.*

nodulosus из налима (Рисунок 6). Тубулины являются компонентами микротрубочек – структур, образующих цитоскелет, центриоли и веретено деления, которые необходимы для внутриклеточного транспорта, поддержания формы клеток и их деления [38]. Эти белки являются обязательными компонентами протеома любого организма и ранее были описаны у гельминтов *E. multilocularis*, *Fasciola hepatica* L., *Schistosoma bovis* (Sonsino, 1876) и других [82, 240].

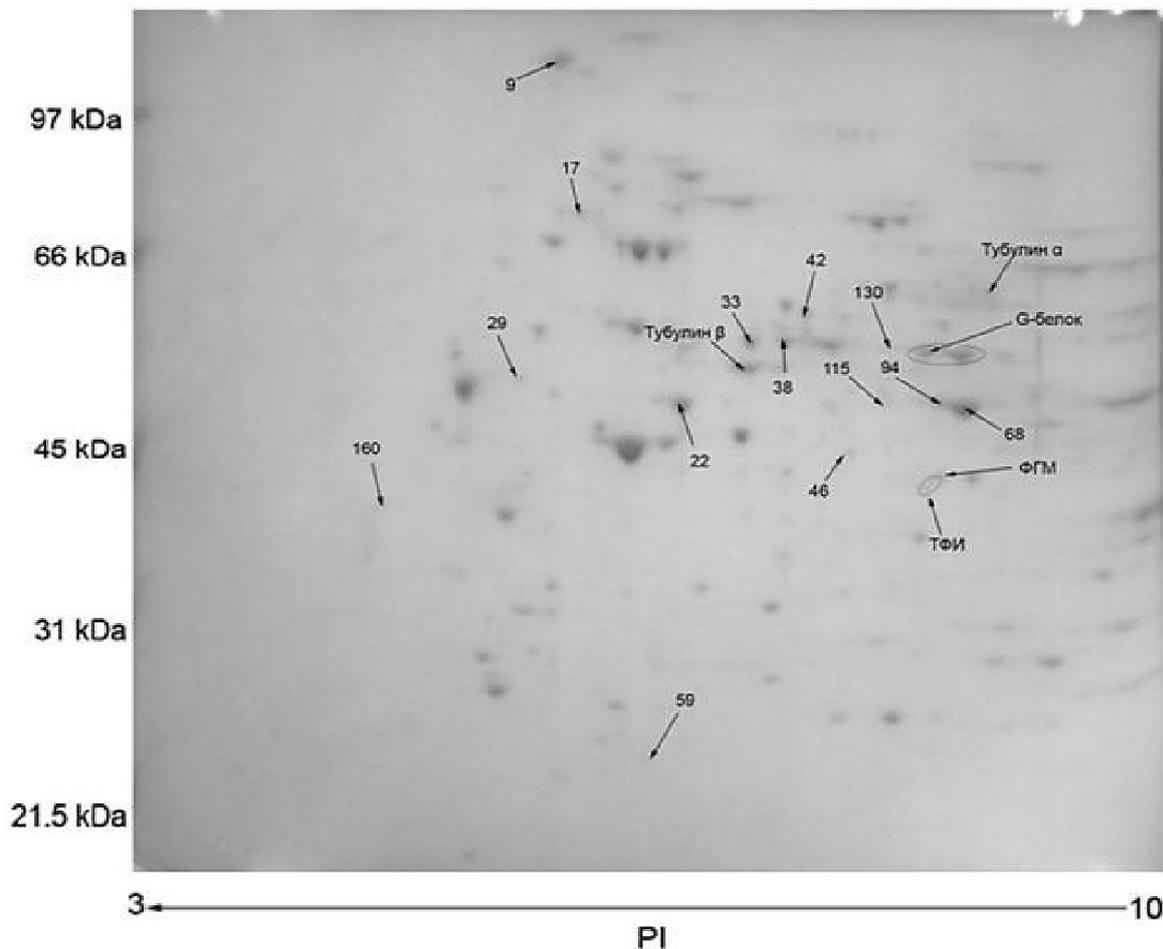


Рисунок 5 - Репрезентативная 2D-электрофореграмма водорастворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus*, на которой отмечены белковые пятна, значительно различающиеся по оптической плотности при сравнении плероцеркоидов из различных хозяев.

Еще один белок, содержание которого существенно выше у плероцеркоидов из окуня по сравнению с плероцеркоидами из налима, был идентифицирован как принадлежащий к семейству G-белков (Рисунок 6). G-белки являются посредниками во внутриклеточных сигнальных каскадах при передаче информации от клеточных рецепторов, взаимодействующих с гормонами, нейротрансммиттерами, хемокинами к эффекторам, отвечающим на это воздействие, а также эти белки участвуют в регуляции эмбрионального развития и поддержании гомеостаза в изменяющихся условиях среды [166]. Одновременное изменение

содержания G-белка и мономерных форм тубулинов у плероцеркоидов *T. nodulosus* из трех хозяев может свидетельствовать о том, что они задействованы в общем метаболическом пути, а именно в сигнальном пути G-белковой регуляции цитоскелета и клеточной морфологии [145, 246]. Известно, что субъединицы β -тубулина обладают ГТФазной активностью и способны непосредственно связываться с альфа-субъединицей G-белков, что приводит к распаду тубулина на мономеры и к дезорганизации микротрубочек. Полученные данные могут указывать на то, что клетки плероцеркоидов *T. nodulosus* из окуня имеют более динамичный цитоскелет, возможно, как результат более активных процессов пролиферации и дифференцировки под действием факторов среды. Выявленные вариации содержания тубулина у плероцеркоидов из трех изученных видов рыб могут косвенно указывать на наличие у червей морфологических различий на клеточном и тканевом уровне, и в том числе на разную степень зрелости плероцеркоидов.

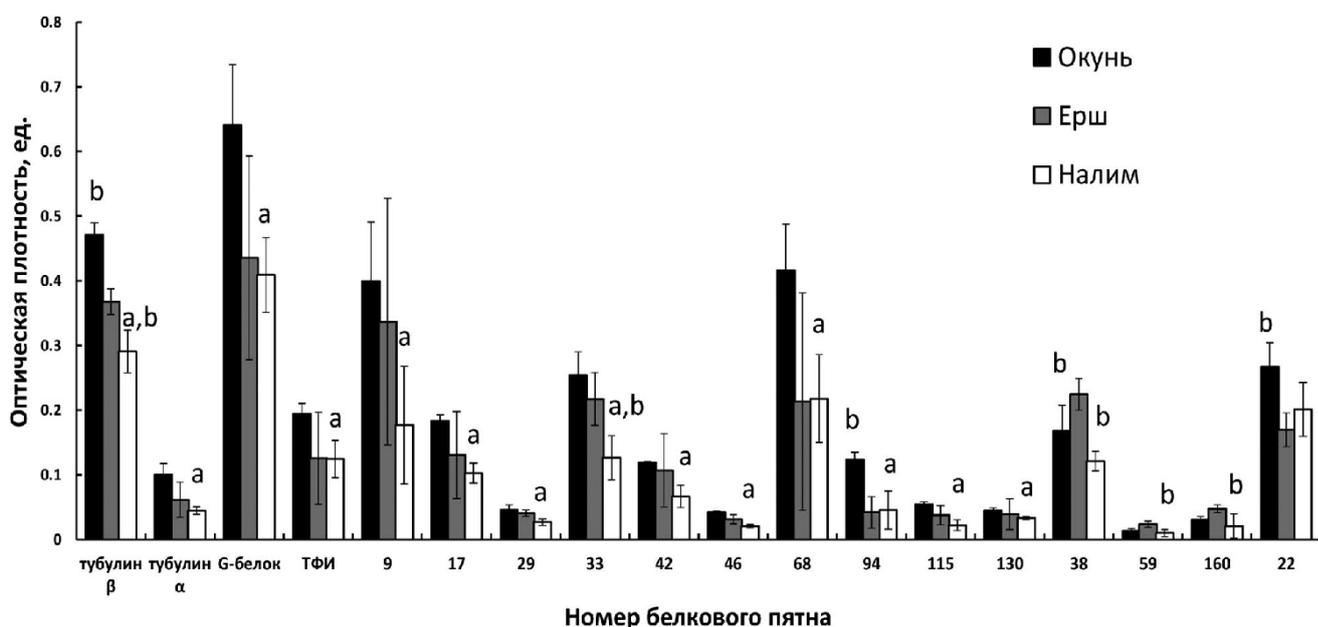


Рисунок 6 - Оптическая плотность некоторых белковых пятен на 2D-электрофореграммах водорастворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus* из разных видов вторых промежуточных хозяев: а – различия статистически значимы по сравнению с плероцеркоидами из окуня (p -value <0.05); б – различия статистически значимы по сравнению с плероцеркоидами из ерша (p -value <0.05).

Плероцеркоиды *T. nodulosus* из окуня и налима также различались по содержанию триозофосфатизомеразы (ТФИ) (Рисунок 6). ТФИ — это фермент углеводного обмена, участвующий в процессе расщепления глюкозы, которая в свою очередь является главным источником энергии для паразитических червей [132]. Более высокое содержание одного из ферментов гликолиза и передачи сигнала у плероцеркоидов окуня по сравнению с

плероцеркоидами из ерша и налима может свидетельствовать об их большей метаболической активности, интенсивности питания и обмена.

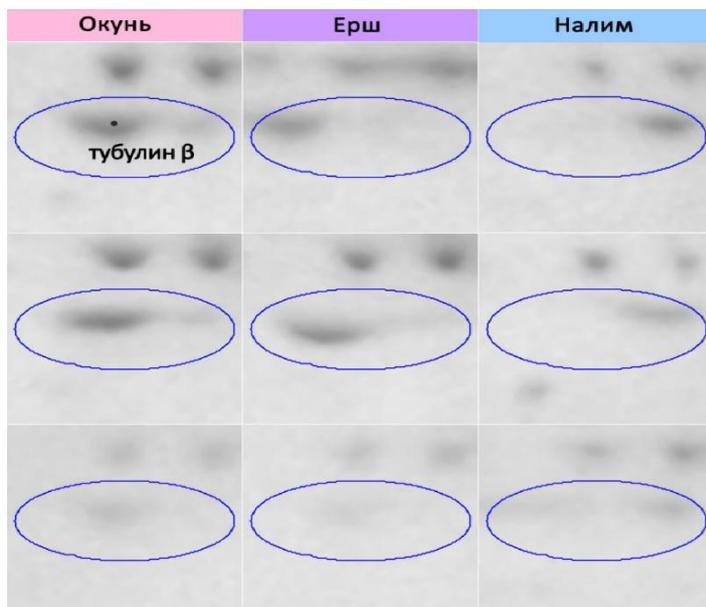


Рисунок 7 - Изображения области пятна (обведены синей линией), содержащего β -тубулин, на электрофореграммах белков плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных вторых промежуточных хозяев.

Следует отметить снижение экспрессии 14 из 170 белков *T. nodulosus* из печени налима, по сравнению с плероцеркоидами из других рыб. Такая реакция может отражать различную степень агрессивности среды гельминта для его развития в зависимости от вида рыбы. Динамика зараженности вторых промежуточных хозяев паразитом *T. nodulosus* в природе указывает на низкую резистентность налимов к инвазии плероцеркоидами *T. nodulosus*. Согласно Куперману [23], из ряда видов рыб европейской части России (корюшка, налим, щука, окунь) только у налимов была зарегистрирована интенсивность заражения равная 7 и более, при экстенсивности инвазии 43% (с общей зараженностью популяции 88%) [23]. Возможно, более благоприятные условия для развития паразитов в налиме, позволяют плероцеркоидам экономить на синтезе специфических белков, необходимых, для поддержания жизнедеятельности и противодействия защитным реакциям хозяина. Окунь, в отличие от налимов, не подвергается массовому заражению *T. nodulosus*, и в природе чаще всего заражены всего одной особью гельминта (при экстенсивности заражения до 89% рыб), тогда как особи с 7 и более плероцеркоидами не встречаются вовсе [23]. Известно, что в большинстве водоемов самовоспроизводство *T. nodulosus* преимущественно происходит через популяционные группировки паразита, заражающие окуня, что говорит о длительной коэволюции данных видов и, как следствие, формировании устойчивых и сбалансированных ценологических отношений [14].

Биохимический состав тканей хозяина также может оказывать влияние на содержание белков паразита, что в свою очередь является результатом генетических различий между отдельными популяциями гельминта, преимущественно приуроченных к различным видам вторых промежуточных хозяев. Наличие таких генетически обособленных гостальных группировок было показано ранее [139, 227]. Полученные результаты демонстрируют влияние на плероцеркоидов *T. nodulosus* условий среды их обитания, что выражается в вариабельности содержания структурных белков, сигнальных молекул и ферментов гликолиза. Выявленные изменения белковых профилей плероцеркоидов *T. nodulosus* могут отражать как влияние абиотических факторов среды второго порядка (температура окружающей среды), так и биохимической разнокачественности среды первого порядка, формируемой хозяевами из различных таксономических групп (окунь, ерш и налим).

3.2. Реорганизация протеома цестоды *Schistocephalus solidus* при переходе от стадии плероцеркоида к половозрелому гельминту

Онтогенетическое развитие цестод сопровождается физиологическими и морфологическими перестройками организма, в основе которых лежит изменение экспрессии определенных генов, что отражается на количественном и качественном составе протеома паразитов. С помощью современных высокопроизводительных масс-спектрометрических методов, можно получить детальную информацию о молекулярных процессах, протекающих при смене фаз жизненного цикла паразитических червей.

В данной работе изучено изменение качественного и количественного состава протеома цестоды *S. solidus*, в эксперименте, имитирующем смену фазы онтогенеза гельминта при переходе от второго промежуточного хозяина к дефинитивному [59]. Плероцеркоиды *S. solidus* паразитируют в полости тела трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* L. около 50-60 дней после заражения рыбы [74]. В течение этого периода у плероцеркоидов *S. solidus* происходит морфофизиологические перестройки, включающие активный рост за счет увеличения мышечных тканей, полный органогенез половой системы и накопление запасных веществ в виде гликогена, в результате чего паразиты становятся инвазионными и способны заразить окончательного хозяина (рыбоядных птиц). При попадании инвазионных плероцеркоидов в пищеварительный тракт птицы, паразиты подвергается резкому значительному нагреву до 40°C, по сравнению с температурой 15–22°C во втором промежуточном хозяине. Изменение температуры среды первого порядка для *S. solidus* является стимулирующим фактором,

который инициирует запуск завершающего этапа полового созревания, синтез и откладку яиц, протекающих в течение следующих 48–72 часов [110, 111, 209, 210]. Для изучения генетически запрограммированных процессов реорганизации протеома цестод при переходе от второго промежуточного хозяина к окончательному проведен эксперимент, в котором инвазионных плероцеркоидов *S. solidus* (вес более 50 мг) инкубировали при температуре 40°C в течение 48 часов до достижения половой зрелости паразитов и выброса ими яиц в среду. В качестве контрольной группы выступали инвазионные плероцеркоиды *S. solidus*, полученные непосредственно из зараженных особей колюшки, и неподвергнутые нагреванию. Также была проведена инкубация инвазионных плероцеркоидов при 22°C в течение 48 часов, но при этом откладка яиц гельминтами не наблюдалась. Это согласуется с данными гистологических и физиологических исследований, демонстрирующих, что для запуска завершающего этапа созревания *S. solidus* необходимо повышение температуры среды и полуанаэробные условия, наблюдаемые внутри организма дефинитивного хозяина [111, 200, 210].

В результате масс-спектрометрического анализа идентифицировано 1408 белков *S. solidus*. Достоверные качественные и количественные различия обнаружены по содержанию 662 белков у червей, инкубированных при 40°C (взрослые черви), и по 434 белкам у червей, инкубированных при 22°C, при сравнении с контрольными образцами. Гельминты *S. solidus*, которых содержали 48 часов при различных температурах (40°C и 22°C), различались по 405 белкам (Рисунок 8А) по сравнению с контрольной группой плероцеркоидов. Таким образом, синтез двух третей всех белков *S. solidus*, инкубировавшихся при 40°C, вызван изменением состава инкубационной среды и/или анаэробными условиями (эта группа белков была названа как «связанные с газовым составом/составом среды»), и только одна треть белков непосредственно реагировала на повышение температуры («связанные с нагреванием»). Поскольку среда для инкубации не полностью имитирует содержимое внутренней среды окончательного хозяина *S. solidus*, белки группы «связанные с газовым составом/составом среды» далее не были рассмотрены. В данном исследовании были описаны 257 белков цестоды *S. solidus*, экспрессия которых достоверно изменялась у червей, подвергшихся длительному нагреванию, по сравнению с плероцеркоидами, что связано со сменой фаз онтогенетического развития паразита.

Ранее в работе Hébert и коллег [104] был проведен сравнительный анализ транскриптома инвазионных плероцеркоидов и взрослых особей *S. solidus*, полученных после инкубации плероцеркоидов при 40°C. Уровень экспрессии около трети генов *S. solidus* значительно изменяется у взрослых червей, что намного больше, чем количество белков, содержание которых изменялось в нашем исследовании. Проведено сравнение транскриптомных данных, описанных в работе Hébert [104], и результатов, полученных в нашем исследовании. В

результате выявлены белки, содержание которых одинаково изменялось в обоих экспериментах. Из них отобрали 81 белок, которые реагировали на повышение температуры, и могут быть рассмотрены как маркеры взрослой стадии или стадии плероцеркоида *S. solidus* (Таблица 4).

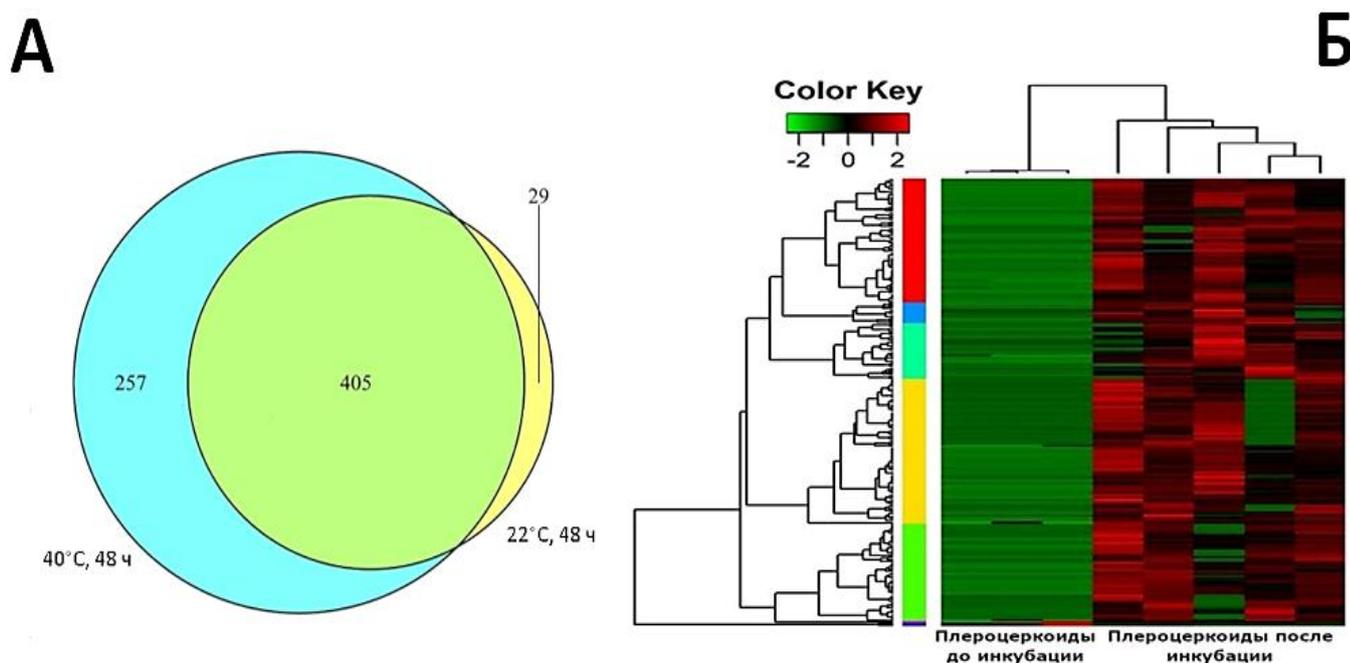


Рисунок 8 - Качественные и количественные изменения протеома инвазионных плероцеркоидов и половозрелых червей *S. solidus*. А - Диаграмма Венна представляет собой перекрытие списков белков, которые значительно различаются по содержания при сравнении опытных групп *S. solidus* с контрольной. Голубой цвет («связанные с нагреванием») - белки, различающиеся по содержанию у паразитов, инкубированных при 40° С в течение 48 часов (взрослые черви), и плероцеркоидов без нагревания. Желтый цвет («не связанные с нагреванием») - белки, различающиеся по содержанию у паразитов, инкубированных при 22° С в течение 48 часов, и плероцеркоидов без нагревания. Зеленый цвет («связанные с газовым составом/составом среды») - белки, различающиеся по содержанию у паразитов всех экспериментальных групп. Б - Тепловая карта белков *S. solidus*, инкубированных при 40° С (взрослые черви), содержание которых значительно изменилось по сравнению с инвазионными плероцеркоидами без инкубации.

Таблица 4 - Белки инвазионных плероцеркоидов и взрослых червей *S. solidus*, для которых выявлены качественные и количественные различия, согласно анализу протеома (наши данные), и соответствующие им транскрипты [104].

ID белка UniprotKB	Название белка	Содержание белков взрослых <i>S. solidus</i> по сравнению с плероцеркоидами (наши данные)	Экспрессия транскриптов взрослых <i>S. solidus</i> по сравнению с плероцеркоидами [104]	Стадия онтогенеза <i>S. solidus</i>
A0A0X3NLP9	Аррестин	Снижение	Снижение	Плероцеркоид
A0A0X3PWQ6	Неохарактеризо- ванный белок	Снижение	Снижение	Плероцеркоид
A0A0X3PMG0	2',3'-циклический- нуклеотид 3'- фосфодиэстераза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A183TCN7	60S рибосомальный белок L31	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PEG5	60S рибосомальный белок L4	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PVG5	Белок-переносчик альфа-токоферола	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PPG3	Семейство антистазинов, предполагаемый белок, содержащий домен цинкового пальца <i>gata</i>	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3Q9Y5	Band 41-подобный белок 3, мембранный	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3QBJ5	BRO1 домен- содержащий белок BROX	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PII4	VTB/POZ домен- содержащий белок At4g08455	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3RQP5	Кальций- связывающий белок 39-подобный	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3RPF49	ЦАМФ-зависимая регуляторная субъединица протеинкиназы II типа	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NUP3	Галокислотная дегалогеназ- подобная гидролаза	Повышение	Повышение	Взрослый

A0A183SV74	Предшественник белка класса хориона с высоким содержанием цистеина	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PWJ8	Сигналомный комплекс COP9 субъединица 1	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0J5H1	Цистатионин-бета-синтаза, цистеин-синтаза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PSE6	Регулирующий развитие GTP-связывающий белок 2	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3P1J9	Дигидропиримидин дегидрогеназа [НАДФ (+)]	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A183SUW1	Член 5 семейства эктонуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PY77	Эстераза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PZY4	Енолаза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NFE6	Эукариотический фактор инициации трансляции 2 субъединица 3	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0J6C2	Эукариотический фактор инициации трансляции 3 субъединица G	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0J9C4	Эукариотический фактор инициации трансляции 4 гамма 3	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A183T8L0	Экспортин-1	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PHW4	Экспрессированный консервативный белок (Expressed conserved protein)	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0J6B4	Ферритин	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PRD3	Ферритин-2	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A183T499	Белок, содержащий ферритин-подобный домен	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NXB6	Ферритин-подобный белок	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PEW6	Белок, содержащий LIM-домены	Повышение	Снижение, Повышение	Взрослый

A0A0V0J5A7	Гомолог белка 1, связанный с синдромом Х-умственной отсталости	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NTV5	Фруктозо-бифосфат альдолаза 1	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PH87	Фруктозо-бифосфат альдолаза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3Q357	Фруктозо-бифосфат альдолаза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3P860	Глутаматдегидроген аза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PAK2	Глутаматдегидроген аза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0J2F3	Гликоген фосфорилаза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NQF0	Глицилпептид N-тетрадеcanoилтрансфераза 2	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PNB0	Белок, содержащий глиоксалазный домен 4	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3P614	Импортин-7	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PLQ1	Инозитол монофосфотаза 1	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0J1M4	Кинуренин-оксоглутарат трансминаза 3	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0J2P0	Белок, содержащий домен С-типа лектина	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PKM2	Белок, содержащий домен С-типа лектина	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PAP7	Лейцин-tR лигаза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NPJ3	Лейцил-аминопептидаза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NQZ0	Лейцил-аминопептидаза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PTK2	Лейцил-аминопептидаза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A183TTF7	L-лактат дегидрогеназа, В цепь	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NLM0	Длинноцепочечные жирные кислоты - КоА-лигаза 4	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0JBP1	Муцин-5АС-подобный белок	Повышение	Повышение	Взрослый

A0A0V0JBF0	NEDD8-активирующий фермент, каталитическая субъединица E1	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PUN9	NEDD8-активирующий фермент, регуляторная субъединица	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0J9U9	NEDD8-конъюгированный фермент UBE2F	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0J9V2	Гомолог нейрокальцина	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3QEA5	NudC домен-содержащий белок 3	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PSR1	Омега-амидаза NIT2	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NVE5	Бета-цепь фенилаланил-tR синтетазы	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A183SN03	Пластин-3	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NJD7	Белок, содержащий домен гидролазы ароматических аминокислот	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NWX2	Пиримидодиазепинс интаза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PR49	Неохарактеризованный белок	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PXJ4	Малая ГТФаза Rab-4B	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NM98	Субъединица SRP68 белка распознавания сигнала	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0JCQ6	Синтенин-1	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A183SUR5	Синтенин-2, секретируемый	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PS92	T-клеточный иммуномодулирующий белок	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NR78	Тенасцин	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PIE0	Тенасцин-С	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0J595	Тубулин, альфа цепь	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NM14	Тубулин, бета цепь	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A183SZY1	Белок 2 двухпорового кальциевого канала, ферритин	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0V0JAC3	Тирозин - tR лигаза	Повышение	Повышение	Взрослый

A0A0X3NTJ1	Универсальный белок стресса MJ0531	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3PJH6	Неохарактеризованный белок	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3P542	Белок, содержащий домен DUF5743	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3P589	Неохарактеризованный белок	Повышение	Повышение, Повышение	Взрослый
A0A0V0J5B5	Гомолог белка VTA1, ассоциированного с вакуолярной сортировкой белков	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NWU1	Валин - tR лигаза	Повышение	Повышение	Взрослый
A0A0X3NGL4	Мембранный белок 712, связанный с везикулами	Повышение	Повышение	Взрослый

Согласно полученным протеомным данным, после инкубации плероцеркоидов *S. solidus* при температуре 40° С в течение 48 часов у червей увеличивался синтез 99% белков (Рисунок 8Б). Это указывает на активацию метаболизма взрослых особей *S. solidus* поскольку им необходимо за 2-3 дня завершить онтогенетический цикл и преобразовать накопленные плероцеркоидами запасные вещества в большое количество гамет и яиц. Такая интенсивная реорганизация метаболизма цестод *S. solidus*, вызванная повышением температуры среды, также следует и из индукции большого количества белков, участвующих в обработке генетической информации (Рисунок 9).

Только два белка, аррестин A0A0X3NLP9 и неохарактеризованный белок A0A0X3PWQ6, преобладали по содержанию у контрольной группы плероцеркоидов, по сравнению с взрослыми червями *S. solidus* (Таблица 4, Рисунок 8Б). В работе Hébert и коллег [104] на уровне транскриптома также было показано снижение экспрессии 5 изоформ аррестина у взрослых червей. Максимальная экспрессия транскриптов изоформы аррестина A0A0X3NLP9 была зарегистрирована у преинвазионных плероцеркоидов, которые еще не набрали достаточной массы (50 мг), у плероцеркоидов, способных инфицировать птиц, экспрессия была еще ниже, а минимальная - у зрелых паразитов. Экспрессия остальных 4 изоформ аррестина была максимальна только у инвазионных плероцеркоидов. Это указывает на важную роль аррестинов для регуляции жизнедеятельности паразита *S. solidus*, функцией которых является передача сигналов, хотя разные изоформы белка регулируют разные периоды их развития. Выравнивание последовательности нехарактеризованного белка A0A0X3PWQ6, экспрессия которого была снижена у взрослых паразитов, выявило его ортологи среди представителей типа

Плоские черви и других организмов, содержащих в своей структуре домен Sgr40, участвующий в рибосомном процессинге, модификации и регуляции РНК-полимераза.

На основании анализа геной онтологии KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [123] можно отметить усиление анаболических процессов в организме взрослых червей *S. solidus*, из которых преобладали пути синтеза и обработки белка (Рисунок 9). После длительного инкубирования с нагреванием инвазионных плероцеркоидов, у червей *S. solidus*, повышался уровень экспрессии 15 рибосомных белков, двух белков ответа на транспорт и сплайсинг мРНК, одного белка, отвечающего за деградацию РНК (РНК-геликаза DDX6), 5 инициаторов трансляции, одного ингибитора трансляции (фактор регулятора трансляции FMRP) и двух факторов терминации трансляции (фактор высвобождения эукариотической пептидной цепи, регуляторная субъединица серин/треониновой протеинфосфатазы 2А).

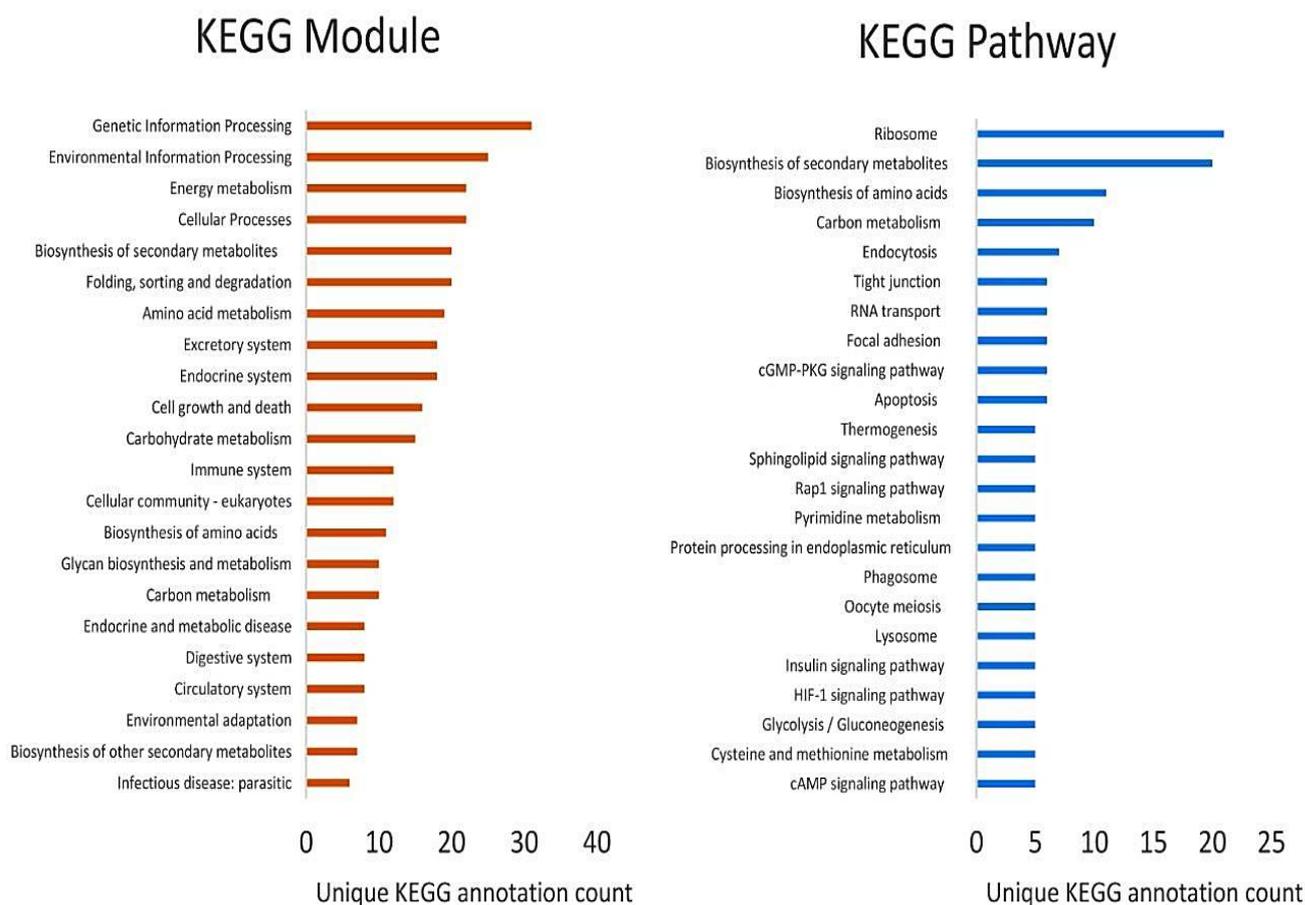


Рисунок 9 - Основные метаболические модули и пути KEGG [123], к которым относятся белки *S. solidus*, значительно различающиеся по содержанию у червей, инкубированных при 40°C (взрослые черви), по сравнению с инвазионными плероцеркоидами (контрольная группа).

Субъединица 3 комплекса сигнальной пептидазы (Signal peptidase complex subunit 3), две субъединицы частицы распознавания сигнала (signal recognition particle) и четыре субъединицы

протеасомы, также обнаружены в большом количестве в протеоме взрослых особей гельминта. Повышенная экспрессия ферментов метаболизма аминокислот, отмеченная у взрослых червей *S. solidus*, указывает на усиленное производство тирозина, триптофана, аланина, серина, глутатиона, цистеина, глутамина, путресцина, спермидина, селеногомоцистеина и других субстратов и регуляторов синтеза белка. Содержание глутаматдегидрогеназы, ключевого фермента переключения азотно-углеродного обмена, также было увеличено у взрослых паразитов по сравнению с инвазионными плероцеркоидами. В клетке этот фермент обеспечивает ассимиляцию аммиака в форме глутамата или, наоборот, высвобождает α -кетоглутарат для цикла трикарбоновых кислот [154, 165, 216]. Глутаматдегидрогеназа обнаружена непосредственно в желточных клетках трематод [36], в большом количестве присутствовала в зрелых проглоттидах *Triaenophorus* spp. [58]. Сверхэкспрессия глутаматдегидрогеназы наблюдалась у половозрелых особей *S. solidus*, *Echinococcus granulosus*, *Opisthorchis felineus* и *Schistosoma mansoni* по сравнению с их личинками, что указывает на его решающую роль в процессе полового созревания плоских червей [87, 104, 186, 250]. Изофермент глутаматдегидрогеназы A0A0X3P860 *S. solidus* содержит в своей структуре последовательность GFGNVG и Glu (278), что более характерно для изоформ, катализирующих реакцию дезаминирования, а не присоединения аммиака [96, 171, 184]. Следовательно, у взрослых *S. solidus* этот фермент, вероятно, обеспечивает НАДФН для окислительно-восстановительных реакций и α -кетоглутарат для анаболизма углеводов несмотря на то, что цикл трикарбоновых кислот, как известно, подавляется в анаэробных условиях.

Использование запасов энергии, накопленных плероцеркоидами в результате распада гликогена, инициировано у взрослых червей *S. solidus* усиленным синтезом гликогенфосфорилазы A0A0V0J2F3, что согласуется с результатами других исследований [45, 47, 104, 112, 130]. Это указывает на то, что зрелые черви потребляют собственные запасы углеводов, хотя эмпирические данные свидетельствуют о сохранении способности поглощать глюкозу у паразитов, культивируемых *in vitro* [111, 112]. У взрослых червей *S. solidus* также наблюдалось повышение содержания ферментов расщепления глюкозы, таких как альдолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, енолаза. В то же время три из пяти изоформ альдолазы (A0A0X3RN87, A0A0X3Q357, A0A0X3NM70), идентифицированных у *S. solidus*, обнаружены только у взрослых червей. Более того, енолазы не обнаружены в транскриптом и протеоме инвазионных плероцеркоидов, когда у взрослых особей присутствовали 6 изоформ данного фермента. У половозрелых червей *S. solidus* также появляется фермент фруктозо-1,6-бисфосфатаза A0A0X3NTV5, который отсутствовал в белковых профилях инвазионных плероцеркоидов. Этот фермент катализирует единственную необратимую реакцию глюконеогенеза, при этом концентрация конкурентного фермента фруктокиназы не изменилась.

Это указывает на то, что гликолиз возможен у взрослых червей, но поток углерода, направлен на производство глюкозы или промежуточных продуктов гликолиза, а не на полное разложение глюкозы.

Подтверждается тот факт, что у взрослых особей *S. solidus* активируется не полный набор ферментов гликолиза/гликогенолиза (Рисунок 10), а только перечисленные выше белки. Остальные гликолитические ферменты остаются на том же уровне, что и у инвазионных плероцеркоидов несмотря на то, что ранее Hébert с коллегами [104] зафиксировали у них снижение экспрессии гликолитических ферментов. Можно предположить, что сверхэкспрессия ферментов гликолиза у зрелых паразитов связана не только с метаболизмом их собственных углеводов, а они могут быть синтезированы на экспорт, поскольку ферменты гликолиза были обнаружены в секретлируемых продуктах мариты трематоды *Opisthorchis felineus*, шистосомул трематоды *Schistosoma japonicum*; метацестод *Taenia solium*; взрослых особей *Hymenolepis diminuta* [25, 53, 67, 234]. Известно, что енолаза является ферментом-маркером экзосом, которые отделяются от клеточных мембран паразита для доставки сигнальных молекул их хозяину [62, 197]. Также различные гликолитические ферменты содержатся в составе оболочки яиц паразитических червей [83].

У цестод окисление глюкозы может приводить либо к образованию лактата, либо к образованию оксалацетата, а затем малата (путь фиксации CO₂) [206]. Это расщепление происходит на уровне фосфоенолпирувата, за который конкурируют пируваткиназа и фосфоенолпируваткарбоксикиназа [81]. Уровень пируваткиназы A0A0X3Q057 и одной из изоформ ФЕПКК A0A183TAV4 был повышен как у червей, которые содержались в анаэробных условиях при 40°C, так и при 22°C, что позволяет предположить, что экспрессия этих ферментов может находиться под контролем газового состава среды организма. В свою очередь, пируват, превращается лактатдегидрогеназой в лактат, который у теплокровного дефинитивного хозяина является конечным продуктом метаболизма *S. solidus* [47, 206]. Показано, что две из трех изоформ лактатдегидрогеназы (A0A183TTF7, A0A3P7E2D4), идентифицированные у *S. solidus*, экспрессируются только у взрослых червей. Этот фермент, вероятно, способствует выработке энергии у червей при недостатке кислорода в кишечнике птиц. Однако в нашем эксперименте изоформы, специфичные для взрослых особей, не обнаружены в белковых экстрактах червей, инкубированных в полуанаэробных условиях при 22°C. Таким образом, наше исследование подтверждает вывод Hébert и коллег [104] о том, что синтез енолазы и некоторых изоформ альдолазы, фруктозо-1,6-бисфосфатазы и лактатдегидрогеназы является фенотипическим маркером половозрелой стадии *S. solidus* и находится под контролем генов, экспрессия которых запускается при повышении температуры среды гельминта. Путь превращения фосфоенолпирувата (продукта гликолиза) находится под

контролем генов, которые регулируются другими факторами, наиболее вероятно, содержанием кислорода или диоксида углерода. Возможно фруктозо-1,6-бисфосфатаза, которая была идентифицирована только у половозрелых червей, у *S. solidus* является регулятором соотношения активности ПК/ФЕПКК, поскольку известно, что фруктозо-1,6-бисфосфат активирует пируваткиназу и, таким образом, усиливает деградацию глюкозы до лактата [68].

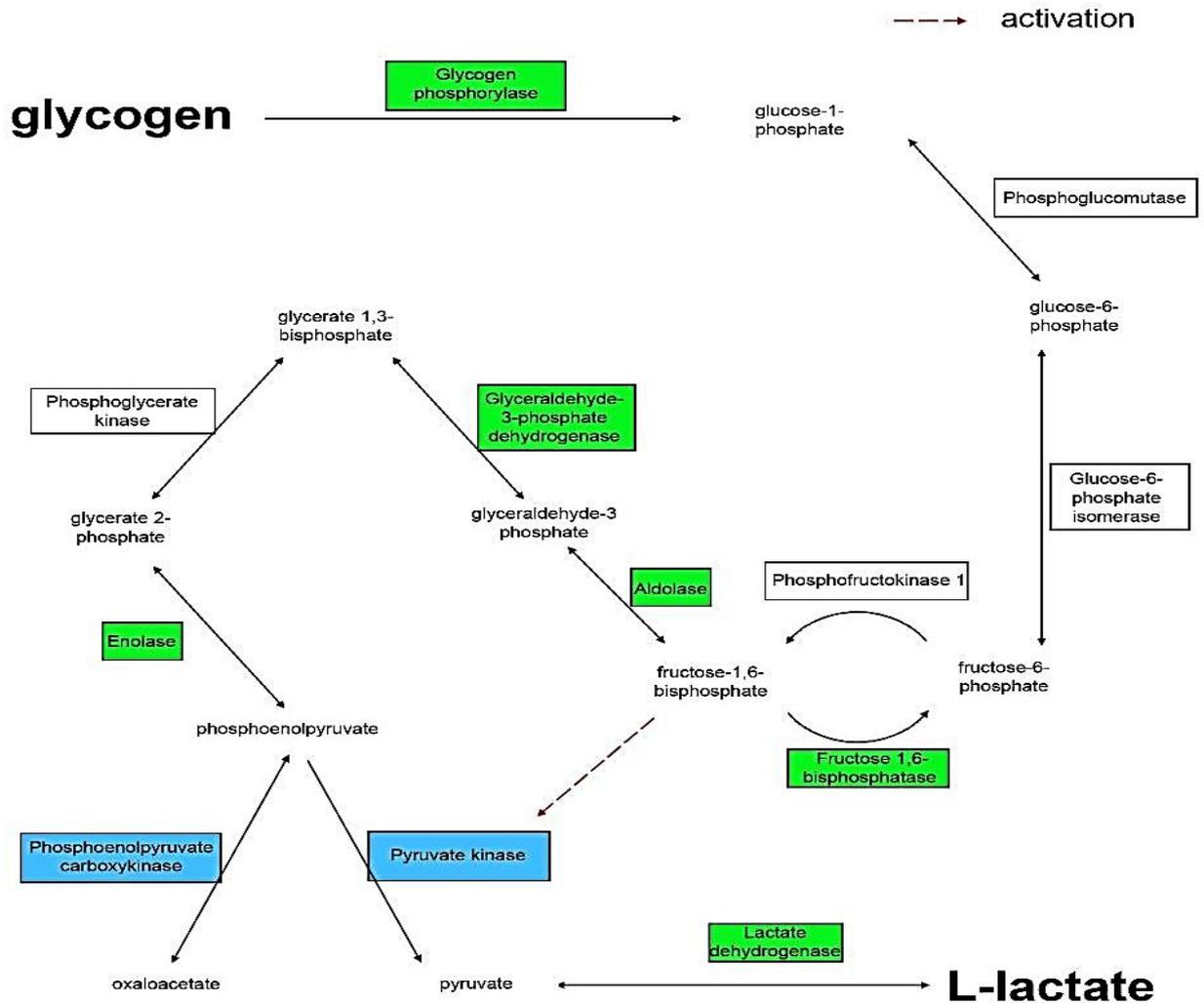


Рисунок 10 - Схема пути гликолиза/гликогенолиза, на которой выделены белки с повышенным содержанием у взрослых червей *S. solidus* по сравнению с инвазионными плероцеркоидами. Зеленым цветом отмечены ферменты, содержание которых повышено у паразитов, инкубированных при 40° С в течение 48 часов (взрослые черви), по сравнению с инвазионными плероцеркоидами (контрольная группа, без инкубации). Голубым цветом отмечены белки, содержание которых было повышено как у червей, инкубированных как при 40°С, так и при 22°С, по сравнению с инвазионными плероцеркоидами (контрольная группа, без инкубации).

На уровне протеома мы не наблюдали достоверного изменения содержания белков, связанных с иммунным ответом у взрослых *S. solidus* по сравнению с инвазионными

плероцеркоидами. Только 12 белков, содержание которых повышено у гельминтов, инкубированных при 40°C, были аннотированы как потенциально участвующие в регуляции иммунной системы, такие как неспецифические регуляторы трансдукции сигнала (протеинкиназы, фосфатаза, белки Ras, A0A0X3Q3W3-белок-транс-белок CALP-N и белок CALNEX2-CALP-CAL-CAL-CAL-C01 и 140-J0J-белок сворачивания и 140-изомераза) и два белка, связанных с подвижностью и адгезией клеток (актин и винкулин). Только катепсин В-подобная пептидаза A0A183SQT2 имеет сигнальный пептид для секреции и, вероятно, участвует в модуляции иммунитета хозяина. Этот белок способен разрушать соединительную ткань хозяина, что указывает на их важную роль в инвазии гельминтов [64, 147, 194]. Поскольку у взрослых особей *S. solidus* ослаблено питание [111, 211], и они не проникают через стенку кишечника птиц, мы можем предположить, что основной причиной повышенного синтеза катепсин В-подобной пептидазы является способность расщеплять иммуноглобулины хозяина и компоненты комплемента [194].

3.3 Изучение паразито-хозяинных отношений плероцеркоидов *S. solidus* и трехиглой колюшки *G. aculeatus*: анализ белкового состава смывов с покровов тела паразита и целомической полости хозяина

Изучен белковый состав смывов с поверхности тела инвазионных плероцеркоидов *S. solidus* и полости тела зараженных (опытная группа) и незараженных (контрольная группа) особей трехиглой колюшки *G. aculeatus* L [129]. В результате масс-спектрометрического анализа и обработки полученных спектров идентифицировано 215 белков. В контрольных образцах содержались белки колюшки, а в смывах опытной группы обнаружены как белки рыб *G. aculeatus*, так и белки *S. solidus*. Сравнительный анализ белкового состава смывов выявил достоверные различия по содержанию 20 белков между зараженными и незараженными особями трехиглой колюшки (Рисунок 11, Таблица 5, Приложение).

В смывах с полости тела зараженных особей колюшки трехиглой наблюдалось повышение содержания серпинов (белки содержащие домены серпина, антитромбин-3, серпиновый ингибитор протеаз, плазминогена, ангиотензина 1-10), компонентов комплемента C9 и C3a, ретинол-связывающего белка и белка, содержащего домен гистона (Рисунок 11, Таблица 5, Приложение). Серпины представляют собой большую группу ингибиторов сериновых протеаз, которые играют важную роль в ряде биологических процессов, таких как свертывание крови, иммунная регуляция, воспаление и фибринолиз. Усиление синтеза данных

белков наблюдалось, в частности, при заражении канального сома *Channel Catfish* (Rafinesque, 1818) бактериями *Edwardsiella ictaluri* (Hawke & al., 1981) и *Flavobacterium columnare* (Bernardet and Grimont 1989) [144]. Один из членов семейства серпинов, серпиновый ингибитор протеаз, или кофактор гепарина, был обнаружен только в смывах зараженных колюшек. Данный белок препятствует формированию сгустка крови, способствует переходу из острой фазы воспаления в хроническую, участвует в ранозаживлении и является аттрактантом для лейкоцитов [109, 121]. В процессах фибринолиза и коагуляции крови также участвует белок плазминоген, синтез которого увеличивался у трехиглых колюшек, зараженных *S. solidus*. Плазминоген также относится к семейству серпиновых пептидаз S1 и является эндопептидазой серпинового типа. Этот белок вместе с фактором коагуляции FVIII связан с системой врожденного иммунного ответа на патогены [239]. В процессе фибринолиза плазминоген активирует каскад ферментативных реакций, направленный на удаление фибрина. Таким образом, у колюшки могут происходить процессы, препятствующие формированию кровяного сгустка и образованию фибриновой капсулы вокруг инородного тела. Это может объяснять отсутствие соединительнотканной оболочки вокруг плероцеркоидов *S. solidus*, наличие которой очень характерно для инцистированных плероцеркоидов других видов цестод. На данном этапе не ясно, является ли блокировка инкапсуляции паразита специфической приспособительной реакцией рыб *G. aculeatus* на инвазию или же происходит под действием молекул, синтезируемых паразитом.

У зараженных рыб *G. aculeatus* по сравнению с незараженными особями отмечено повышение содержания белков, участвующих в активации клеточного иммунного ответа. Так, ангиотензины - это компоненты ренин-ангиотензиновой системы, которая является мощным регулятором кровяного давления и гомеостаза электролитов в организме рыб [192]. Эти белки регулируют интенсивность кровообращения в зоне воспаления, а, следовательно, интенсивность миграции иммунных клеток, а также запускают каскады воспалительных реакций. Ретинол-связывающий белок 4 отвечает за трансмембранный перенос ретинола необходимого для синтеза ретиноловой кислоты. Ретиноиды, в свою очередь, регулируют жизненно важные процессы, за счет того, что выполняют роль сигнальных молекул при делении клеток, росте и дифференцировке тканей эктодермального, энтодермального и мезодермального происхождения во время эмбриогенеза [148]. Таким образом, данный белок у особей *G. aculeatus* может выступать в роли медиатора воспаления, вызванного паразитарной инвазией. Ретинол-связывающий белок 4 также ассоциирован с развитием нечувствительности к инсулину, поэтому его повышенная экспрессия может быть признаком нарушения углеводного обмена в присутствии гельминта, в том числе, и под действием сигнальных молекул паразита.

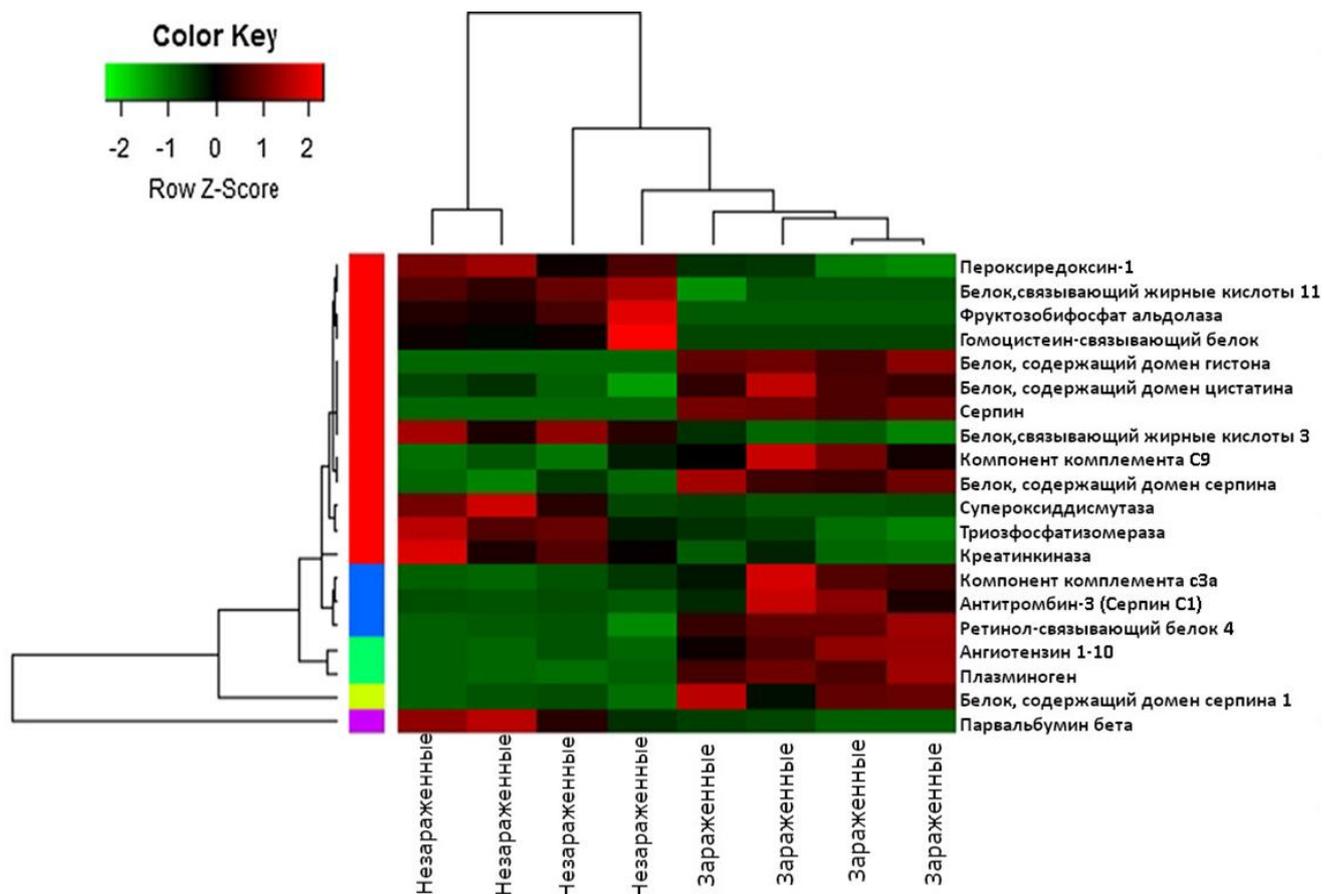


Рисунок 11 - Тепловая карта белков смывов из полости тела *G. aculeatus*, содержание которых значимо различалось при сравнении образцов зараженных и незараженных рыб. Изменение цвета кластера от зеленого до красного отражает увеличение содержание белка.

Одним из белков, которые обнаружены только в смывах зараженных колюшек, но отсутствовали в образцах здоровых рыб, был неохарактеризованный белок, содержащий домен гистона, из семейства ядерных белков Histone H2B. Гистоны — это основные компоненты нуклеосом, в клетке участвуют в процессе передачи наследственных паттернов экспрессии генов и в эпигенетической регуляции. Гистоны активно секретируются нейтрофилами и тучными клетками и вне клеток являются мощными активаторами апоптоза и воспаления. Таким образом, внеклеточные гистоны являются маркерами воспаления, вызванного как инфекционными агентами, так и факторами эндогенного происхождения [71]. Их синтез у зараженных особей рыб *G. aculeatus* свидетельствуют об активации клеточного иммунитета. Еще одним важным белком, задействованным в первой линии защиты от чужеродного вторжения, являются белки цистатины, содержание которых было повышено у зараженных рыб. Этот фермент регулирует активность цистеиновых протеиназ, которые, в свою очередь, контролируют такие процессы как презентация антигенов и фагоцитарная активность

макрофагов [252]. Кроме того, эти белки могут инактивировать протеиназы паразитов, и поэтому могут играть роль в защите хозяина от их проникновения [75].

Зараженные рыбы характеризовались усилением синтеза белка неклеточного иммунитета - компонента комплемента C9. Этот белок непосредственно участвует в формировании мембраноатакующего комплекса на поверхности чужеродных клеток-мишеней. Повышение экспрессии мРНК C9 было показано в различных органах южного сома *Silurus meridionalis* (Chen, 1977) при заражении бактерией *Aeromonas hydrophila* (Chester 1901) [91]. Другой компонент системы комплемента C3a, содержание которого было повышено в полости тела зараженных рыб, является важным иммуномодулятором, в зависимости от условий обладающим провоспалительным или противовоспалительным эффектом.

В смывах с полости тела зараженных особей колюшки, по сравнению с незараженными рыбами, снижено содержание триозфосфат изомеразы, креатинкиназы, фруктоз-бифосфат альдозазы, супероксиддисмутаза, пероксидоксина-1, гомоцистеин-связывающего белка, парвальбумина и переносчиков жирных кислот. Среди перечисленных белков можно выделить белки, участвующие в энергетических процессах рыб: гликолитические ферменты триозфосфат изомераза и фруктоз-бифосфат альдозаза, а также креатинкиназа, катализирующая синтез креатинфосфата из аденозинтрифосфата и креатина, который является высокоэнергетическим соединением, компенсирующим затраты АТФ. Следует отметить, что данные ферменты вне клеток выполняют иную, нежели внутри клеток, функцию, и, как правило, сигнальную. У зараженных колюшек была подавлена экспрессия компонентов антиоксидантной защиты, таких как супероксиддисмутаза и пероксиредоксин-1, защищающих организм от токсичных кислородных радикалов. Инактивация данных ферментов у зараженных особей рыб *G. aculeatus* может играть защитную роль, способствуя усилению токсического действия супероксид радикала, выбрасываемого нейтрофилами, для уничтожения обнаруженного патогена в ходе реакции «кислородного взрыва». Также в полости тела зараженных особей трехиглой колюшки отсутствовал гомоцистеин-связывающий белок, обнаруженный в образцах из здоровых рыб. Этот белок участвует в синтезе и регуляции метаболизма гомоцистеина, который, в свою очередь, участвует в синтезе метионина [173]. Функция данного белка во внеклеточном пространстве рыб на данный момент не ясна. Однако гомоцистеин является медиатором развития окислительного стресса, поэтому можно предположить, что уменьшение содержания его переносчика приводит к высвобождению гомоцистеина и усилению каскада окислительных реакций, направленных на борьбу с патогеном.

Смывы от зараженных рыб *G. aculeatus* отличались пониженным содержанием сразу двух белков, связывающих жирные кислоты FABP 3 и FABP 11a. Белки этого семейства участвуют в транспорте жирных кислот и других гидрофобных компонентов [231]. Поскольку

данные белки задействованы в переносе важных сигнальных молекул, в частности эйкозаноидов, ключевых медиаторов воспаления, снижение их экспрессии может указывать не только на уменьшение потребления жиров гельминтом, но также может свидетельствовать об измененном иммунном статусе зараженных особей колюшки [114]. Снижение синтеза белков, связывающих жирные кислоты, может быть признаком развития воспалительной реакции в ответ на заражение, или быть следствием действия иммуносупрессорных молекул, секретлируемых паразитом. Смывы с целомической полости незараженных рыб *G. aculeatus* отличались повышенным содержанием парвальбуминов, которые у рыб участвуют в процессе расслабления различных видов мышц [127, 134]. Отмечается высокая устойчивость данных белков к нагреванию и действию пищеварительных ферментов.

В смывах из полости тела зараженных особей трехиглой колюшки и с поверхности тела инвазионных плероцеркоидов *S. solidus* обнаружено 30 белков паразита (Таблица 6, Приложение). Большая часть идентифицированных белков *S. solidus* имела уникальную структуру, значительно отличающуюся от структуры известных белков других организмов, и функция этих белков неизвестна. В смывах с полости тела зараженных колюшек идентифицированы два белка *S. solidus*, участвующих в окислительно-восстановительном процессе, такие как малатдегидрогеназа и один неохарактеризованный белок, содержащий домен малатдегидрогеназы. У гельминтов малатдегидрогеназы играют большую роль в получении энергии из глюкозы и связаны с преодолением последствий окислительного стресса. Помимо этого, в смывах из полости тела рыб выявлены белки *S. solidus* семейства аннексинов, серпины, профилин, пептидил-пролил цис-транс изомеразы, белок, связывающий жирные кислоты. Аннексины являются широко распространенным семейством белков среди эукариотических организмов. Их характерной способностью является обратимое кальций-зависимое связывание с фосфолипидами [212]. Аннексины участвуют в таких биологических процессах как воспалительный ответ, апоптоз, передача сигнала, слияние мембран и экзоцитоз, антикоагуляция, регуляция ионных каналов и клеточная миграция. Предполагают, что аннексины паразитов способны влиять на иммунный статус хозяина [66], например, подавляя его иммунный ответ [101, 102]. Также отмечается участие данных белков в осуществлении биохимических взаимодействий между паразитом и его хозяином [101, 219]. Примечательно, что, как и особи трехиглой колюшки, плероцеркоиды *S. solidus* выделяют во внеклеточную среду сериновые протеазы семейства серпинов. Серпины играют ключевую роль в процессах свертывание крови, активации комплемента и воспалении [161]. Эти белки идентифицированы у паразитических червей из разных систематических групп (*Ascaris* spp., *Brugia malayi* (Brug, 1927), *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859), *Onchocerca volvulus* (Bickel, 1982), *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803), *Trichinella spiralis* (Railliet, 1895), *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809),

Paragonimus westermani (Kerbert, 1878), *Echinococcus* spp. и др.), а их роль для паразитов может быть связана с регулированием иммунных реакций хозяина.

Пептидил-пролил цис-транс изомеразы (иммунофилин), участвуют в фолдинге синтезированных в организме белков и иммунных реакциях [203]. Иммуномодулирующие свойства этих ферментов могут объяснять их широкое распространение у различных паразитических организмов [48], однако механизм действия этих ферментов до конца не ясен. Тирозин протеин фосфатаза Н является еще одним белком *S. solidus* с потенциально иммуносупрессорным действием, обнаруженным в полости тела зараженных рыб *G. aculeatus*. Известно, что тирозин протеин фосфатазы Н представляют собой сигнальные молекулы, которые регулируют множество клеточных процессов, включая рост, дифференциацию, митотический цикл и онкогенную трансформацию. У различных паразитических организмов фосфатаза Н является обычным компонентом секреторных продуктов. Ранее была показана способность этого фермента снижать пролиферацию мононуклеарных клеток и экспрессию комплексов гистосовместимости [85]. Белок структурно схожий с лизин-тРНК лигазой (лизин-тРНК синтетаза, аминоксил-тРНК синтетаза), обнаруженный среди секретируемых *S. solidus* белков, напротив, стимулирует развитие воспалительного процесса. Этот белок вовлечен в созревание, активацию и привлечение иммунных клеток. Секреция данного белка была показана у лейшманий и возбудителя малярии. При этом было показано, что белки паразитов связывались с макрофагами хозяина, что вызывало секрецию цитокинов фактора некроза опухоли TNF- α и интерлейкина-6 [169]. Можно предположить, что данный белок играет большую роль в метаболизме самих паразитов (регуляции биосинтеза белков), при этом обладает сильными иммуногенными свойствами для хозяина. Белки семейства дегликаз белков и нуклеиновых кислот участвуют в различных биохимических процессах организмов. Их основная функция заключается в восстановлении гликелированных аминокислот и нуклеотидов, что ведет к активации/деактивации многих белков и пептидов. В том числе отмечена роль дегликаз в преодолении последствий окислительного стресса [202]. Белок северин (гензолин) является компонентом актин-связывающего комплекса, и вероятно, является компонентом тегумента паразита. Белки, связывающие жирные кислоты — это внутриклеточные белки, которые нековалентно связывают жирные кислоты, участвуют в захвате жирных кислот и их транспорте [39]. Они идентифицированы у ряда представителей типа Плоские черви [251]. Известно, что паразиты не способны синтезировать *de novo* собственные жирные кислоты и стероиды, поэтому зависят по данным элементам от хозяина. В связи с этим белки цестод из семейства FABP, обнаруженные и в полости тела колюшек, зараженных *S. solidus*, рассматривают как основной способ получения необходимых для гельминта ЖК. Таким образом, среди секретируемых паразитом *S. solidus* белков были обнаружены, главным образом,

иммуннорегуляторные и транспортные белки, что отражает основные стратегии выживания паразита, а именно способы нейтрализации гельминтом защитных реакций хозяина и получение необходимых питательных элементов.

В результате идентификации, функциональной аннотации и количественного анализа белковых профилей смывов из полости тела зараженных и незараженных особей трехиглой колюшки *G. aculeatus* и покровов тела инвазионных плероцеркоидов *S. solidus*, выявлено, что в смывах зараженных рыб и паразита преобладали различные компоненты системы клеточной иммунной защиты, свидетельствующие об активном их взаимодействии. Обнаружено, что в результате инвазии у колюшек происходит ослабление, местных антиоксидантных реакций, вероятно, для усиления действия атакующих нейтрофилов хозяина. Отмечено одновременное снижение содержания белков-переносчиков жирных кислот у рыб и секреция данных белков плероцеркоидами *S. solidus*. Можно предположить, что данные молекулы выполняют различные функции, и у паразита синтез FABP имеет компенсаторный характер, например, для удаления из среды гидрофобных медиаторов воспаления. Плероцеркоиды *S. solidus* и особи трехиглой колюшки секретируют разнообразные ингибиторы сериновых протеиназ семейства серпинов, которые обладают мощными иммуномодуляторными свойствами. Таким образом, на примере исследования белкового состава смывов с поверхности тела цестод *S. solidus* и целомической полости зараженных и незараженных рыб *G. aculeatus*, показано, что на границе контакта паразита и его хозяина осуществляется активное молекулярное взаимодействие, направленное на поддержание их жизнедеятельности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ленточные черви являются облигатными эндопаразитами со сложным жизненным циклом. Паразитический образ жизни цестод определяет их биологические и экологические особенности, в основе которых лежат молекулярные механизмы организма. Изучение метаболизма, в том числе описание белкового состава, как одного из важнейших компонентов функционирования организмов, позволит углубить знания о биохимических адаптациях паразитов и выявить особенности взаимоотношений в системе «паразит-хозяин».

В нашем исследовании впервые проведено детальное профилирование белков цестод *Triaenophorus nodulosus*, *T. crassus* и *Schistocephalus solidus* на различных стадиях жизненного цикла. Сколекс, незрелые и зрелые проглоттиды плероцеркоидов и взрослых *T. nodulosus* и *T. crassus* имели различный качественный и количественный состав белков. Зрелые сегменты стробилы по сравнению со сколексом червей характеризовались снижением содержания цитоскелетных и двигательных белков (актин, парамиозин, миозин и тропомиозин 2) и повышением содержания глутаматдегидрогеназы и бета-индуцированного фактора роста ig-h3, относящегося к суперсемейству фасциклинов.

При сравнении паттерна белков, синтезируемых на различных стадиях жизненного цикла *T. nodulosus* и *T. crassus*, выявлены различия в экспрессии парамиозина и тяжелой цепи миозина у плероцеркоидов и взрослых червей, что, вероятно, отражает морфологические изменения в организме паразитов при их развитии в теле дефинитивного хозяина.

Среди идентифицированных белков, по содержанию которых различаются белковые профили *T. nodulosus* и *T. crassus*, особое внимание обращает на себя неохарактеризованный белок DN24645_TRINITY. Количественное содержание данного белка в сколексах плероцеркоидов *T. nodulosus* было равным или даже выше, чем содержание актина, основного белка наблюдаемого в протеомах гельминтов. При этом белок DN24645_TRINITY полностью отсутствует в сколексах и других частях тела червей *T. crassus*.

Проведен сравнительный анализ протеомов плероцеркоидов *T. nodulosus*, извлеченных из печени различных видов вторых промежуточных хозяев: окуня *Perca fluviatilis* L., ерша *Gymnocephalus cernuus* L. и налима *Lota lota* L. Плероцеркоиды из всех трех видов рыб различались по содержанию белков микротрубочек тубулинов, регуляторного G-белка и фермента углеводного обмена триозофосфатизомеразы.

Протеомы взрослых особей *S. solidus* по сравнению с инвазионными плероцеркоидами характеризовались повышением синтеза белков, участвующих в анаболических процессах, главным образом, путях биосинтеза вторичных метаболитов и аминокислот. Также у зрелых

червей отмечалась активация ферментов обмена углеводов, таких как гликогенфосфорилаза, альдолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, енолаза, фруктозо-1,6-бисфосфатаза. Это указывает на активацию метаболизма взрослых червей *S. solidus* из-за необходимости в течение 2-3 дней завершить онтогенетический цикл и преобразовать накопленную личинками энергию в большое количество гамет и яиц. Такая интенсивная реорганизация метаболизма гельминтов, вызванная повышением температуры среды, также следует и из активации белков, участвующих в обработке генетической информации.

В жизнедеятельности паразитов и их хозяев важное место занимают секретируемые ими белки, регулирующие их взаимоотношения. На примере исследования белкового состава смывов с поверхности тела инвазионных плероцеркоидов *S. solidus* и целомической полости зараженных и незараженных рыб *G. aculeatus*, показано, что у зараженных рыб повышено содержание белков, которые играют важную роль в процессах свертывании крови, иммунной регуляции, воспалении и фибринолизе. К таким белкам относились ряд ингибиторов сериновых протеаз (белки, содержащие домены серпина, антитромбин-3, серпиновый ингибитор протеаз, плазминогена, ангиотензина 1-10), цистатины, регулирующие активность цистеиновых протеиназ и компоненты системы комплемента. В смывах с полости тела зараженных особей трехиглой колюшки по сравнению с незараженными рыбами выявлено снижение содержания триозфосфатизомеразы, креатинкиназы, фруктоз-бисфосфат альдолазы, супероксиддисмутазы, пероксидоксина-1, гомоцистеин-связывающего белка, парвальбумина и переносчиков жирных кислот. Среди белков, секретрируемых плероцеркоидами *S. solidus* при инвазии, которые, вероятно, участвуют в регуляции воспалительных и иммунных реакций хозяина и паразита, отмечены серпины (ингибиторы сериновых протеаз), пептидил-пролил цис-транс изомераза, тирозин протеинфосфатаза H, аннексин, а также белки, связывающие жирные кислоты, необходимые для их транспорта от хозяина к паразиту.

Таким образом, выявленные впервые изменения в составе белковых профилей *T. nodulosus*, *T. crassus* и *S. solidus* при смене фаз их онтогенетического развития, свидетельствуют о количественной и качественной вариабельности протеома плероцеркоидов и взрослых особей цестод, и отражает разнокачественность их адаптивных механизмов к изменяющимся факторам среды первого и второго порядка.

ВЫВОДЫ

1. Белковый состав различных отделов стробилы плероцеркоидов и взрослых червей *T. nodulosus* и *T. crassus* изменяется от сколекса к зрелым членикам. Содержание цитоскелетных и двигательных белков снижается в дистальных отделах стробилы, что может отражать морфологические изменения в проглоттидах. Зрелая часть стробилы отличается более высоким содержанием бета-индуцированного фактора роста ig-h3, глутаматдегидрогеназы и пропионил-КоА-карбоксилазы, что указывает на интенсификацию процессов образования энергии и синтеза белка.
2. Белковые профили плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных видов вторых промежуточных хозяев отражают особенности гостальной специфичности паразита. Плероцеркоиды *T. nodulosus*, паразитирующие у окуней, отличаются повышенным содержанием β -тубулина, G-белка и триозофосфатизомеразы, по сравнению с гельминтами из других промежуточных хозяев (ерш и налим), что может свидетельствовать о влиянии метаболизма хозяина на количественный состав белков паразита.
3. Установлено, что у зрелых особей *S. solidus* по сравнению с инвазионными плероцеркоидами повышено содержание белков, которые участвуют в метаболических превращениях белков и в генерации энергии на путях катаболизма углеводов.
4. В целомической полости особей трехиглой колюшки *G. aculeatus*, зараженных плероцеркоидами *S. solidus*, обнаружены белки рыб и паразита, участвующие в регуляции иммунных и воспалительных процессов, а также в метаболизме жирных кислот.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АОС - антиоксидантная система
- АТФ - аденозинтрифосфат
- АФК - активные формы кислорода
- БСА - бычий сывороточный альбумин
- ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГАФДГ - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
- ДТТ - дитиотреитол
- ЖК - жирные кислоты
- ЛДГ - лактатдегидрогеназа
- МДГ - малагдегидрогеназа
- ПААГ - полиакриламидный гель
- ПК - пируваткиназа
- СБК - система биотрансформации ксенобиотиков
- СОД - супероксиддисмутаза
- ТФИ - триозофосфатизомераза
- ТФУ - трифторуксусная кислота
- ТЭАБ - триэтиламмония бикарбонат
- ФГК - фосфоглицераткиназа
- ФЕПК - фосфоенолпируваткарбоксилаза
- ФЕПКК - фосфоенолпируваткарбоксикиназа
- ФМО - флавинсодержащие монооксигеназы
- ФФК - 6-фосфофруктокиназа
- ЦНС - центральная нервная система
- ЦТК - цикл трикарбоновых кислот
- ЭСБ - экскреторно-секреторные белки
- АВС - АТР-binding cassette (АТФ-связанные кассетные транспортеры)
- АСАТ - acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ацил-СоА холестеринацилтрансфераза)
- ВСА - bichinchonic acid (бицинхониновая кислота)
- САА - 2-chloracetamide (2-хлорацетамид)
- СУР - cytochrome P450 (цитохром Р-450)
- ЕСТ - expressed sequence tags
- ФАВР - fatty acid-binding protein (белок, связывающий жирные кислоты)

FDR - false discovery rate (частота ложноположительных результатов)

FN - fibronectin (фибронектин)

GPx - glutathione peroxidase (глутатионпероксидаза)

GST - glutathione S-transferase (глутатион S-трансфераза)

HSP - heat shock proteins (белки теплового шока)

Ig - immunoglobulin (иммуноглобулин)

LAP - leucyl aminopeptidases (лейцинаминопептидаза)

Pgp - permeability glycoprotein, P-glycoprotein (P-гликопротеин)

PMSF - phenylmethane sulfonyl fluoride (фенилметан сульфонилфторид)

Prxs - peroxiredoxins (пероксиредоксины)

PSMs - peptide-spectrum matches (общее количество спектров идентифицированных пептидов, совпадающих с белком)

SDS - sodium dodecyl sulfate (додецилсульфат натрия)

TCEP - (tris(2-carboxyethyl) phosphine) (трис(2-карбоксиэтил) фосфин)

TGFBI - transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 (бета-индуцированный фактор роста ig-h3)

USP - universal stress proteins (универсальные стрессовые белки)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аникиева, Л.В. Морфологическая изменчивость цестод рода *Proteocephalus* (Cestoda, Proteocephalidae) при паразитировании в факультативных хозяевах / Л.В.Аникиева // Паразитология. - 1995. - Т. 29. - № 6. - С.505–510.
2. Аникиева, Л.В. Морфологическая изменчивость цестоды *Proteocephalus percae* (Müller 1780), паразитирующей у сиговых рыб / Л.В.Аникиева, Е.П.Иешко, Д.И.Лебедева // Паразитология. - 2015. - Т. 49. - № 3. - С.160–170.
3. Аникиева, Л.В. Полиморфизм и внутривидовая изменчивость специфичного паразита корюшек – цестоды *Proteocephalus tetrastomus* (Rudolphi, 1810) (Cestoda: Proteocephalidea) / Л.В.Аникиева, Г.Н.Доровских // Паразитология. - 2009. - Т. 43. - № 4. - С.309–316.
4. Аникиева, Л.В. Принципы популяционной морфологии в систематике цестод / Л.В.Аникиева // Проблемы цестодологии. - 1998. - С.33–40.
5. Буренина, Э.А. Фосфатазы цестод *Bothriocephalic scorpii* и влияние на них антигельминтных препаратов / Э.А.Буренина // Паразитология. - 2009. - № 43. - С.2.
6. Высоцкая, Р.У. Сравнительно-биохимические исследования в системе *Schistocephalus solidus* (Cestoda)-колюшка трехиглая *Gasterosteus aculeatus* L. / Р.У. Высоцкая, Е.П. Иешко, Н.В. Евсеева // Паразитология. – 2003. – Т. 37. – № 6. – С. 503-511.
7. Высоцкая, Р.У. О содержании липидов у некоторых гельминтов пресноводных рыб / Р. У. Высоцкая, В. С. Сидоров // Паразитология. – 1973. – Т. 7. – № 1. – С. 51-57.
8. Гиченок, А.А. Изменчивость и фенотипическое разнообразие скребня *Echinorhynchus gadi* (Acanthocephala) из двух видов беломорских рыб / А.А.Гиченок // Зоологический журнал. - 1995. - Т. 74. - № 8. - С.15–62.
9. Долгих, В.В. Изучение ферментов биосинтеза пуриновых нуклеотидов у плероцеркоидов цестод сем. Ligulidae / В.В.Долгих, Е.А.Долгих, В.Д.Домкин // Паразитология. - 1992. - № 26. - С. 4.
10. Дубинина, М.Н. О естественной системе рода *Schistocephalus* Creplin (Cestoda, Ligulidae) / М.Н.Дубинина // Зоол. журн. - 1959 - Т. 38. - № 10. - С. 1498-1517.
11. Дубинина, М.Н. Ремнецы Cestoda: Ligulidae фауны СССР. Монографическое исследование / М.Н.Дубинина. - М. - Л.: Наука, 1966. - 261 с.
12. Дубинина, М.Н. Состояние и очередные задачи систематики ленточных червей (Cestoidea Rud., 1808) / М.Н.Дубинина // Паразитология. - 1974. - Т. 8. - № 4. - С. 281-292.

13. Жигилева, О.Н. Взаимосвязь зараженности гельминтами и генетического разнообразия популяций животных: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.02.04 / Жигилева Оксана Николаевна. – Тюмень, 2017. – 22 с.
14. Иешко, Е. П. Популяционная биология гельминтов рыб / Е.П.Иешко. - Л.: Наука, 1988. - 118 с.
15. Извекова, Г.И. Пищевые адаптации у низших цестод - паразитов рыб / Г. И. Извекова // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. – № 6. – С.605-617.
16. Извекова, Г.И. Протеолитические ферменты и их ингибиторы у цестод / Г.И. Извекова, Т.В.Фролова // Успехи современной биологии. – 2016. – Т. 136. – № 4. – С.404-416.
17. Извекова, Г.И. Физиологическая специфика взаимоотношений между *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda) и его хозяевами рыбами / Г.И.Извекова // Паразитология. - 2001. - Т. 35. - № 1. - С.60-68.
18. Корнева, Ж.В. Тканевая пластичность и морфогенезы у цестод / Ж.В.Корнева, Ж.В.Корнева. - Российская акад. наук, Ин-т биологии внутренних вод им. И. Д. Папанина. – Москва: Наука, 2007. - 188 с.
19. Кочнева, А. А. Протеомные исследования особенностей жизнедеятельности паразитических червей / А.А.Кочнева, Е.В.Борвинская, Д.С.Бедулина, Л.П.Смирнов, И.В.Суховская // Паразитология. – 2018. – Т. 52. – № 3. – С. 177-204.
20. Кочнева, А.А. Сравнение профиля белков плероцеркоидов цестоды *Triaenophorus nodulosus* из различных промежуточных хозяев / А.А.Кочнева, Е.В.Борвинская, Д.С.Бедулина, И.В.Суховская // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2018. – № 12. – С. 87-98. DOI: 10.17076/eb899.
21. Крылов, Ю.М. Активность ЛДГ и изменение спектра ее изоферментов в печени леща *Abramis brama* при паразитировании плероцеркоидов цестоды *Digamma interrupta* / Ю.М.Крылов // Паразитология. - 1993. - Т. 27. - № 4. - С.332–335.
22. Кузьмина, В.В. Особенности физиологии питания цестод и их хозяев–рыб / В.В.Кузьмина, Г.И.Извекова, Б.И.Куперман // Успехи современной биологии. – 2000. – Т. 120. – № 4. – С. 384–384.
23. Куперман, Б.И. Ленточные черви *Triaenophorus* — паразиты рыб (экспериментальная систематика и экология) / Б.И.Куперман. - Ленинград: Наука, 1973. - 207 с.
24. Куперман, Б.И. Функциональная морфология низших цестод. / Б.И.Куперман. - Ленинград: Наука, 1988. - 168 с.
25. Львова, М.Н. Секретом мариты печеночного сосальщика *Opisthorchis felineus* / М. Н.Львова, Т.Г.Дужак, Ю.П.Центалович, А.В.Катохин, В.А.Мордвинов // Паразитология. - 2014. - Т. 48. - № 3. - С.169-184.

26. Малютина, Т.А. Нейропептиды у плоских червей (трематоды, цестоды, турбеллярии): локализация, функция, рецепторы / Т.А.Малютина, Н.Б.Теренина, Н.Д.Крещенко // Ученые записки Казанского университета. Серия: Естественные науки. – 2013. – Т. 155. – № 3. – С.129-154.
27. Сергеева, Е.Г. Факторы паразито-хозяйинной специфичности / Е.Г.Сергеева, С.А.Безр // Актуальные проблемы общей паразитологии. – М.: Наука, 2000. – С. 192–204.
28. Сидоров, В.С. Жирнокислотный состав некоторых гельминтов холоднокровных и теплокровных позвоночных / В. С.Сидоров, Л. П.Смирнов // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 1980. – Т. 16. – № 6. – С. 551-555.
29. Сидоров, В.С. Сравнительная биохимия гельминтов рыб : аминокислоты, белки, липиды / В.С. Сидоров, Р.У. Высоцкая, Л.П. Смирнов, С.Д. Гурьянова. – Ленинград : Наука. Ленинградское отделение, 1989. – 152 с. – ISBN 5-02-025690-0.
30. Смирнов, Л. П. Жирнокислотный состав лизосомальных мембран цестод *Eubothrium crassum* и *Diphyllobothrium dendriticum* / Л.П.Смирнов, В.В.Богдан // Паразитология. – 1992. – Т. 26. – № 3. – С. 234-239.
31. Смирнов, Л.П. Глутатион s-трансферазы у гельминтов / Л.П.Смирнов, Е.В.Борвинская, А.А.Кочнева, И.В.Суховская // Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2015. – № 11. – С. 3-14. – DOI 10.17076/eb213.
32. Смирнов, Л.П. Система биотрансформации ксенобиотиков у гельминтов. Сходство и отличие от аналогичных систем хозяев (обзор) / Л.П.Смирнов, Е.В.Борвинская, И.В. Суховская // Паразитология. – 2016. – Т. 50. – № 6. – С.432-445.
33. Теренина, Н.Б. Нейротрансмиттеры у гельминтов (биогенные амины, оксид азота) / Н.Б.Теренина, М.К.С.Густафссон. - Рос. акад. наук. Ин-т паразитологии. – Москва: Наука, 2003. – 179 с.
34. Теренина, Н.Б. О наличии нейропептидов у плоских червей / Н.Б.Теренина, Т.А.Малютина, Н.Д.Крещенко // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2014. – № 15. – С.304-308.
35. Шульц, Р.С. Основы общей гельминтологии.Т.2: Биология гельминтов / Р.С.Шульц, Е.В.Гвоздев. - Москва: Наука, 1972. - 516 с.
36. Abidi, S.M.A. Characterization of the glutamate dehydrogenase activity of *Gigantocotyle explanatum* and *Gastrothylax crumenifer* (Trematoda: Digenea) / S.M.A.Abidi, P.Khan, M.K.Saifullah // J Parasit Dis. - 2009. - Vol. 33. - N 1–2. - P.57–64. DOI: 10. 1007/ s12639- 009-0010-7.
37. Ahn, C.S. Fasciclin-calcareous corpuscle binary complex mediated protein-protein interactions in *Taenia solium* metacestode / C.S.Ahn, J.G.Kim, Y.A.Bae, S.H.Kim, J.H.Shin, Y.Yang,

I.Kang, Y.Kong // Parasit Vectors. - 2017. - Vol. 10. - N 1. - P.438. DOI: 10.1186/s13071-017-2359-2.

38. Alberts, B. Molecular biology of the cell (third edition) / B.Alberts, D.Bray, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, J.D.Watson. - New York and London: Garland Publ., 1994. 1361 p. DOI: 10.1016/0307-4412(94)90059-0.

39. Alvite, G. *Echinococcus granulosus* fatty acid binding proteins subcellular localization / G.Alvite, A.Esteves // Exp Parasitol. - 2016. - Vol. 164. - P.1-4. DOI: 10.1016/j.exppara.2016.02.002.

40. Amri, M. A protective effect of the laminated layer on *Echinococcus granulosus* survival dependent on upregulation of host arginase / M.Amri, C.Touil-Boukoffa // Acta Trop. - 2015. - Vol. 149. - P.186-94. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.05.027.

41. Arme, C. A surface enzyme in *Hymenolepis diminuta* (cestoda) / C.Arme, C.P.Read // J Parasitol. - 1970. - Vol. 56. - N 3. - P.514-6.

42. Ashburner, M. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. / M.Ashburner, C.A.Ball, J.A.Blake, D.Botstein, H.Butler, J.M.Cherry, A.P.Davis, K.Dolinski, S.S.Dwight, J.T.Eppig, M.A.Harris, D.P.Hill, L.Issel-Tarver, A.Kasarskis, S.Lewis, J.C.Matese, J.E.Richardson, M.Ringwald, G.M.Rubin, G.Sherlock // Nat Genet. - 2000. - Vol. 25. - № 1. P.25-9. DOI: 10.1038/75556.

43. Aziz, A. Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans / A.Aziz, W.Zhang, J.Li, A.Loukas, D.P.McManus, J.Mulvenna // J Proteomics. - 2011. - Vol.74. - N 9. - P.1560-72. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.02.021.

44. Barber, I. The three-spined stickleback-*Schistocephalus solidus* system: an experimental model for investigating host-parasite interactions in fish / I.Barber, J.P.Scharsack // Parasitology. - 2010. - Vol. 137. - N 3. - P.411-24. DOI: 10.1017/S0031182009991466.

45. Barrett, J. Energy metabolism and infection in helminths / J.Barrett // Symposia of the British Society for Parasitology. - 1977. - Vol. 15. - P.121-144.

46. Barrett, J. Parasite proteomics / J.Barrett, J.R.Jefferies, P.M.Brophy // Parasitol Today. - 2000. - Vol. 16. - N 9. - P.400-3. DOI: 10.1016/s0169-4758(00)01739-7.

47. Beis, I. The contents of adenine nucleotides and glycolytic and tricarboxylic acid cycle intermediates in activated and non-activated plerocercoids of *Schistocephalus solidus* (Cestoda: Pseudophyllidea) / I.Beis, J.Barrett // International Journal for Parasitology. - 1979. - Vol. 9. - P.465-468.

48. Bell, A. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases (immunophilins) and their roles in parasite biochemistry, host-parasite interaction and antiparasitic drug action / A.Bell, P.Monaghan, A.P.Page // Int J Parasitol. - 2006. - Vol. 36. - N 3. - P.261-276. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.11.003.

49. Berger, C.S. The parasite *Schistocephalus solidus* secretes proteins with putative host manipulation functions / C.S.Berger, J.Laroche, H.Maaroufi, H.Martin, K.M.Moon, C.R.Landry, L.J.Foster, N.Aubin-Horth // *Parasit Vectors*. - 2021. - Vol. 14. - N 1. - P.436. DOI: 10.1186/s13071-021-04933-w.
50. Berger, C.S. The secretome of a parasite alters its host's behaviour but does not recapitulate the behavioural response to infection / C.S.Berger, N.Aubin-Horth // *Proc Biol Sci*. - 2020. - Vol. 287. - N 1925. - P.20200412. DOI: 10.1098/rspb.2020.0412.
51. Berger, J. Microtrichial polymorphism among hymenolepid tapeworms as seen by scanning electron microscopy / J.Berger, D.F.Mettrick // *Trans Am Microsc Soc*. - 1971. - Vol. 90. - N 4. - P.393–403.
52. Berggren, M.I. Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin / M.I.Berggren, B.Husbeck, B.Samulitis, A.F.Baker, A.Gallegos, G.Powis // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. - 2001. - Vol. 392. - P.103–109.
53. Bień, J. Mass spectrometry analysis of the excretory-secretory (E-S) products of the model cestode *Hymenolepis diminuta* reveals their immunogenic properties and the presence of new E-S proteins in cestodes / J.Bień, R.Salamatin, A.Sulima, K.Savijoki, D.B.Conn, A.Näreaho, D.Młocicki // *Acta Parasitologica*. - 2016. - Vol. 61. - N 2. - P.429–442. DOI: 10.1515/ap-2016-0058.
54. Binns, D. QuickGO: a web-based tool for Gene Ontology searching / D.Binns, E.Dimmer, R.Huntley, D.Barrell, C.O'Donovan, R.Apweiler // *Bioinformatics*. - 2009. - Vol. 25. - N 22. - P.3045-3046. DOI:10.1093/bioinformatics/btp536.
55. Biron, D.G. Host-parasite molecular cross-talk during the manipulative process of a host by its parasite / D.G.Biron, H.D.Loxdale // *J Exp Biol*. - 2013. - Vol. 216. - P.148–160.
56. Biron, D.G. The proteomics: a new prospect for studying parasitic manipulation / D.G.Biron, C.Joly, N.Galeotti, F.Ponton, L.Marché // *Behavioural processes*. - 2005 - Vol. 68. - N 3. - P.249–253. DOI: 10.1016/j.beproc.2004.08.016.
57. Biserova, N.M. GABA in the nervous system of the cestodes *Diphyllobothrium dendriticum* (Diphyllobothriidea) and *Caryophyllaeus laticeps* (Caryophyllidea), with comparative analysis of muscle innervation / N.M.Biserova, I.A.Kutyrev, K.Jensen // *J Parasitol*. - 2014. - Vol.100. - N 4. - P.411-21. DOI: 10.1645/13-366.1.
58. Borvinskaya, E. Comparative analysis of proteins of functionally different body parts of the fish parasites *Triaenophorus nodulosus* and *Triaenophorus crassus* / E.Borvinskaya, A.Kochneva, D.Bedulina, I.Sukhovskaya, L.Smironov, I.Babkina // *Acta Parasit*. - 2021a. - Vol. 66. - P.1137–1150. DOI: 10.1007/s11686-021-00384-6.

59. Borvinskaya, E.V. Temperature-induced reorganisation of *Schistocephalus solidus* (Cestoda) proteome during the transition to the warm-blooded host / E.V.Borvinskaya, A.A.Kochneva, P.B.Drozdova, O.V.Balan, V.G.Zgoda // Biol Open. - 2021b. - Vol. 10. - N 11. - P.bio058719. DOI: 10.1242/bio.058719.
60. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M.Bradford // Anal Biochem. - 1976. - Vol. 72. - P.248-54. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
61. Brophy, P.M., Barrett J. Glutathione transferase in helminths / P.M.Brophy, J.Barrett // Parasitology. - 1990. - Vol. 100. - Pt 2. - P.345-9. DOI: 10.1017/s0031182000061369.
62. Buck, A.H. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity / A.H.Buck, G.Coakley, F.Simbari, H.J.McSorley, J.F.Quintana, T. Le Bihan, S.Kumar, C.Abreu-Goodger, M.Lear, Y.Harcus, A.Ceroni, S.A.Babayan, M.Blaxter, A. Ivens, R.M.Maizels // Nat Commun. - 2014. - Vol. 5. - P.5488. DOI: 10.1038/ncomms6488.
63. Burenina, E.A. Fructose bisphosphatase of cestodes of *Bothriocephalus scorpii* / E.A.Burenina // J Evol Biochem Phys. - 2010. - Vol. 46. - P.153–162. doi: 10.1134/S0022093010020031.
64. Caffrey, C.R. Cysteine proteases as digestive enzymes in parasitic helminths / C.R.Caffrey, L.Goupil, K.M.Rebello, J.P.Dalton, D.Smith // PLoS Negl Trop Dis. - 2018. - Vol. 12. - N 8. - P.e0005840. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005840.
65. Camargo de Lima, J. Comparative proteomics of the larval and adult stages of the model cestode parasite *Mesocestoides corti* / J.Camargo de Lima, K.M.Monteiro, T.N. Basika Cabrera, G.P.Paludo, H.Moura, J.R.Barr, A.Zaha, H.B.Ferreira // J Proteomics. - 2018. - Vol. 175. - P.127-135. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.12.022.
66. Cantacessi, C. A genomewide analysis of annexins from parasitic organisms and their vectors / C.Cantacessi, J.M.Seddon, T.L.Miller, C.Y.Leow, L.Thomas, L.Mason, C.Willis, G.Walker, A.Loukas, R.B.Gasser // Sci Rep. - 2013. - Vol. 3. - P.2898. DOI: 10.1038/srep0 2893.
67. Cao, X. Excretory/secretory proteome of 14-day schistosomula *Schistosoma japonicum* / X.Cao, Z.Fu, M.Zhang, Y.Han, Q.Han, K.Lu, H.Li, C.Zhu, Y.Hong, J.Lin // J Proteomics. - 2016. - Vol. 130. - P. 221-230. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.10.001.
68. Carter, C.E. Multienzymic nature of pyruvate kinase during development of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) / C.E.Carter, D.Fairbairn // J Exp Zool. - 1975. - Vol. 194. - N 2. - P.439-48. DOI: 10.1002/jez.1401940210.

69. Chalar, C. Molecular cloning and characterization of a thioredoxin gene from *Echinococcus granulosus* / C.Chalar, C.Martinez, A.Agorio, G.Salina, J.Soto, R.Ehrlich // *Biochem Biophys Res Commun.* - 1999. - Vol. 262. - P.302–307.
70. Chemale, G. Proteomic analysis of the larval stage of the parasite *Echinococcus granulosus*: Causative agent of cystic hydatid disease / G.Chemale, A.J.van Rossum, J.R.Jefferies, J.Barrett, P.M.Brophy, H.B.Ferreira, A.Zaha // *Proteomics.* - 2003. - Vol. 3. - P. 1633–1636 DOI:10.1002/pmic.200300487.
71. Chen, R. Release and activity of histone in diseases / R.Chen, R.Kang, X.Fan, D.Tang // *Cell Death Dis.* - 2014. - Vol. 5. - P.e1370. DOI: 10.1038/cddis .2014.337.
72. Chen. T.W. FunctionAnnotator, a versatile and efficient web tool for non-model organism annotation / T.W.Chen, R.C.Gan , Y.K.Fang, K.Y.Chien, W.C.Liao, C.C.Chen, T.H.Wu, I.Y.F.Chang, C.Yang, P.J.Huang, Y.M.Yeh, C.H.Chiu, T.W.Huang, P.Tang // *Sci Rep.* - 2017. - Vol.7. - N 1. - P.10430. DOI:10.1038/s41598-017-10952-4.
73. Chiumiento, L. Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites / L.Chiumiento, F.Bruschi // *Parasitol Res.* - 2009. - Vol. 105. - N 3. - P.593-603. doi: 10.1007/s00436-009-1483-0.
74. Clarke, A. 1954. Studies on the life cycle of the pseudophyllidean cestode *Schistocephalus solidus* / A.Clarke // *Journal of Zoology.* - 1954. - Vol. 124. - N 2. - P.257-302.
75. Coombs, G.H. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation / G.H.Coombs, J.C.Mottram // *Parasitology.* - 1997. - Vol. 114. - P.S61–S80.
76. Coskun, K.A. Heat shock protein 40-Gok1 isolation from *Toxoplasma gondii* RH strain / K.A.Coskun, A.Ozgun, B.Otag, M.Mungan, Y.Tutar // *Protein Peptide Letters.* - 2013. - Vol. 20. - P.1294–1301.
77. Couso, J.P. Segmentation, metamerism and the Cambrian explosion / J.P.Couso // *Int J Dev Biol.* - 2009. - Vol. 53. - P. 8–10.
78. Cox, J. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification / J.Cox, M.Mann // *Nat Biotechnol.* - 2008. - Vol. 26. - N 12. - P.1367-72. DOI: 10.1038/nbt.1511.
79. Cui, S.J. Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host-parasite interactions / S.J.Cui, L.L.Xu, T.Zhang, M.Xu, J.Yao, C.Y.Fang, Z.Feng, P.Y.Yang, W.Hu, F.Liu // *J Proteomics.* - 2013. - Vol. 12. - P.84:158-75. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.04.013.
80. Cvilink, V. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths / V.Cvilink, J.Lamka, L.Skállová // *Drug Metab Rev.* - 2009. - Vol. 41. - N 1. - P.8-26. DOI: 10.1080/03602530802602880.

81. Das, B. Differential kinetics at PK/PEPCK branch point in the cestode, *Raillietina echinobothrida* / B.Das, Ramnath, A.K.Dutta, V.Tandon // *Exp Parasitol.* - 2015. - Vol. 153. - P.151-9. DOI: 10.1016/j.exppara.2015.03.023.
82. De la Torre Escudero, E. Comparative proteomic analysis of *Fasciola hepatica* juveniles and *Schistosoma bovis* schistosomula / E.De la Torre Escudero, R.Manzano-Román, L.Valero, A.Oleaga, R.Pérez-Sánchez, A.Hernández-González, M.Siles-Lucas // *J. Proteom.* - 2011. - Vol. 74. - P.1534–1544. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.05.024.
83. Dewalick, S. The proteome of the insoluble *Schistosoma mansoni* eggshell skeleton / S.Dewalick, M.L.Bexkens, B.W.van Balkom, Y.P.Wu, C.H.Smit, C.H.Hokke, P.G.de Groot, A.J.Heck, A.G.Tielens, J.J.van Hellemond // *Int J Parasitol.* - 2011. - Vol. 41. - N 5. - P.523-32. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.12.005.
84. Dzik, J.M. MDewey olecules released by helminth parasites involved in host colonization / J.M.Dzik // *Acta Biochim Pol.* - 2006. - Vol. 53. - N 1. - P.33–64.
85. Ehsan, M. The serine/threonine-protein phosphatase 1 from *Haemonchus contortus* is actively involved in suppressive regulatory roles on immune functions of goat peripheral blood mononuclear cells / M.Ehsan, W.Wang, J.A.Gadahi, M.W.Hasan, M.M.Lu, Y.J.Wang, X.C.Liu, M.Haseeb, R.F.Yan, L.X.Xu, X.K.Song, X.R.Li // *Front Immunol.* - 2018. - Vol. 9. - P.1627. DOI: 10.3389/fimmu .2018.01627.
86. El Kabbany, A. Ultrastructural studies of the tegument and excretory system of the cestode *Nematotaenia kashmirensis* (Fotedar 1966) infecting the toad *Bufo regularis* in Egypt / A.El Kabbany // *Egypt J Aquat Biol Fish.* 2009. - Vol. 13. - N 4. - P.17–34. DOI: 10. 21608/ ejabf. 2009. 2042.
87. Ershov, N.I. New insights from *Opisthorchis felineus* genome: update on genomics of the epidemiologically important liver flukes / N.I.Ershov, V.A.Mordvinov, E.B.Prokhortchouk, M.Y.Pakharukova, K.V.Gunbin, K.Ustyantsev, M.A.Genaev, A.G.Blinov, A.Mazur, E.Boulygina, S.Tsygankova, E.Khrameeva, N.Chekanov, G.Fan, A.Xiao, H.Zhang, X.Xu, H.Yang, V.Solovyev, S.M.Lee, X.Liu, D.A.Afonnikov, K.G.Skryabin // *BMC Genom.* - 2019. - Vol. 20. - N 1. - P.399. DOI:10. 1186/ s12864- 019- 5752-8.
88. Espinola, S.M. Evolutionary fates of universal stress protein paralogs in Platyhelminthes / S.M.Espinola, M.P.Cancela, L.Brisolara Corrêa, A.Zaha // *BMC Evol Biol.* - 2018. - Vol. 18. - N 1. - P.10. DOI: 10.1186/s12862-018-1129-x.
89. Fabbri, E. HSP expression in bivalves / E.Fabbri, P.Valbonesi, S.Franzellitti // *Invertebr Surviv J.* - 2008. - Vol. 5. - P.135–161.

90. Fan, H.Y. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals / H.Y.Fan, Q.Y.Sun // *Biol Reprod.* - 2004. - Vol. 70. - N 3. - P.535-47. DOI: 10.1095/biolreprod.103.022830.
91. Fu, Y.W. Molecular characterization, expression analysis, and ontogeny of complement component C9 in southern catfish (*Silurus meridionalis*) / Y.W.Fu, C.K.Zhu, Q.Z.Zhang, T.L.Hou // *Fish Shellfish Immunol.* - 2019. - Vol. 86. - P.449–458. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.11.069.
92. Glorieux, C. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells / C.Glorieux, M.Zamocky, J.M.Sandoval, J.Verrax, P.B.Calderon // *Free Radic Biol Med.* - 2015. - Vol. 87. - P.84-97. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017.
93. Gomez, S. Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in *Taenia solium* reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR) / S.Gomez, L.Adalid-Peralta, H.Palafox-Fonseca, V.A.Cantu-Robles, X.Soberón, E.Sciutto, G.Fragoso, R.J.Bobes, J.P.Laclette, P.Yauner Ldel, A.Ochoa-Leyva // *Sci Rep.* - 2015. - Vol. 5. - P.9683. DOI: 10.1038/srep09683.
94. Götz, S. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite / S.Götz, J.M.García-Gómez, J.Terol, T.D.Williams, S.H.Nagaraj, M.J.Nueda, M.Robles, M.Talón, J.Dopazo, A.Conesa // *Nucleic Acids Res.* - 2008. - Vol. 36. - N 10. - P.3420-3435. DOI:10.1093/nar/gkn176.
95. Granath, W.O. An ultrastructural examination of the scolex and tegument of *Bothriocephalus acheilognathi* (Cestoda: Pseudophyllidea) / W.O.Granath, J.C.Lewis, G.W. Esch // *Trans Am Microsc Soc.* - 1983. - Vol. 102. - N 3. - P.240–250.
96. Grzechowiak, M. Structural studies of glutamate dehydrogenase (Isoform 1) from *Arabidopsis thaliana*, an important enzyme at the branch-point between carbon and nitrogen metabolism / M.Grzechowiak, J.Sliwiak, M.Jaskolski, M.Ruszkowski // *Front Plant Sci.* - 2020. - Vol. 11. - P.754. DOI: 10.3389/fpls.2020.00754.
97. Gundry, R.L. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow / R.L.Gundry, M.Y.White, C.I.Murray, L.A.Kane, Q.Fu, B.A.Stanley, J.E. Van Eyk // *Curr Protoc Mol Biol.* - 2009. - Chapter 10. - Unit 10. - P.25. DOI: 10.1002/0471142727.mb1025s88.
98. Haas, B.J. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis / B.J.Haas, A.Papanicolaou, M.Yassour, M.Grabherr, P.D.Blood, J.Bowden, M.B.Couger, D.Eccles, B. Li, M.Lieber, M.D.MacManes, M.Ott, J.Orvis, N.Pochet, F.Strozzi, N.Weeks, R.Westerman, William T., C.N.Dewey, R.Henschel, R.D.LeDuc, N.Friedman, A.Regev // *Nat Protoc.* - 2013. - Vol. 8. - N 8. - P.1494-512. DOI: 10.1038/nprot.2013.084.

99. Hammerschmidt, K. Surface carbohydrate composition of a tapeworm in its consecutive intermediate hosts: individual variation and fitness consequences / K.Hammerschmidt, J.Kurtz // *Int J Parasitol.* - 2005. - Vol. 35. - N 14. - P.1499-507. DOI: 10.1016/j.ijpara.2005.08.011.
100. Harnett, W. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators / W. Harnett // *Mol Biochem Parasitol.* - 2014. - Vol. 195. - N 2. - P.130-6. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2014.03.007.
101. He, L. Biochemical and immunological characterization of annexin B30 from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products / L.He, M.Y.Ren, X.Q.,Chen, X.Y.Wang, S.Li, J.S.Lin, C.Liang, P.Liang, Y.Hu, H.L.Lei // *Parasitol Res.* - 2014. - Vol. 113. - P.2743–2755. DOI: 10.1007/s00436-014-3935-4.
102. He, L. Calcium-dependent proapoptotic effect of *Taenia solium* metacestodes annexin B1 on human eosinophils: a novel strategy to prevent host immune response / L.He, M.Y.Ren, X.Q.Chen, X.Y.Wang, S.Li, J.S.Lin, C.Liang, P.Liang, Y.Hu, H.L.Lei // *Int J Biochem Cell Biol.* - 2008. - Vol. 40. - P.2151–2163. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.02.018.
103. Hébert, F.O. Ecological genomics of host behavior manipulation by parasites / F.O.Hébert, N.Aubin-Horth // *Adv Exp Med Biol.* - 2014. - Vol. 781. - P.169-90. DOI: 10.1007/978-94-007-7347-9_9.
104. Hébert, F.O. Major host transitions are modulated through transcriptome-wide reprogramming events in *Schistocephalus solidus*, a threespine stickleback parasite / F.O.Hébert, S.Grambauer, I.Barber, C.R.Landry, N.Aubin-Horth // *Mol Ecol.* - 2017. - Vol. 26. - N 4. - P.1118-1130. DOI: 10.1111/mec.13970.
105. Hébert, F.O. Transcriptome sequences spanning key developmental states as a resource for the study of the cestode *Schistocephalus solidus*, a threespine stickleback parasite / F.O.Hébert, S.Grambauer, I.Barber, C.R.Landry, N.Aubin-Horth // *Gigascience.* - 2016. - Vol. 5. - P.24. DOI: 10.1186/s13742-016-0128-3.
106. Henkle-Dührsen, K. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes / K.Henkle-Dührsen, A.Kampkötter // *Mol Biochem Parasitol.* - 2001. - Vol. 114. - N 2. - P.129–42.
107. Herbert, B. Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when, and how? / B.Herbert, M.Galvani, M.Hamdan, E.Olivieri, J.MacCarthy, S.Pedersen, P.G.Righetti // *Electrophoresis.* - 2001. - Vol. 22. - № 10. - P.2046-57. DOI: 10.1002/1522-2683(200106)22:10<2046::AID-ELPS2046>3.0.CO;2-C.
108. Hidalgo, C. Proteomics analysis of *Echinococcus granulosus* protoscolex stage / C.Hidalgo, M.PGarcía, C.Stoore, J.P.Ramírez, K.M.Monteiro, U.Hellman, A.Zaha, H.B.Ferreira, N.Galanti, E.Landerer, R.Paredes // *Vet Parasitol.* - 2016. - Vol. 218. - P.43-5. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.12.026.

109. Hoffman, M. Characteristics of the chemotactic activity of heparin cofactor II proteolysis products / M.Hoffman, C.W.Pratt, L.W.Corbin, F.C.Church // *J Leukoc Biol.* - 1990. - Vol. 48. - N 2. P.156–162. DOI:10.1002/jlb.48.2.156.
110. Hopkins, C.A. Notes on the morphology and life history of *Schistocephalus solidus* (Cestoda: Diphyllbothriidae) / C.A.Hopkins, J.D.Smyth // *Parasitology.* - 1951. - Vol. 41. N 3-4. - P.283-91. DOI: 10.1017/s0031182000084134.
111. Hopkins, C.A. Studies on cestode metabolism. I. Glycogen metabolism in *Schistocephalus solidus* in vivo / C.A.Hopkins // *J Parasitol.* - 1950. - Vol. 36. - N 4. - P.384-90.
112. Hopkins, C.A. Studies on cestode metabolism. II. The utilization of glycogen by *Schistocephalus solidus* in vitro / C.A.Hopkins // *Experimental Parasitology.* - 1952. - Vol. 1. - P.196–213.
113. Hopkins, C.A. Studies on cestode metabolism. IV. The nitrogen fraction in the large cat tapeworm, *Hydatigera (Taenia) taeniaeformis* / C.A.Hopkins, W.M.Hutchison // *Exp Parasitol.* - 1958. - Vol. 7. - N 3. - P.349-65. DOI: 10.1016/0014-4894(58)90031-6.
114. Hotamisligil, G.S. Metabolic functions of FABPs—mechanisms and therapeutic implications / G.S.Hotamisligil, D.A.Bernlohr // *Nat Rev Endocrinol.* - 2015. - Vol. 11. - N 10. - P.592–605. DOI: 10.1038/nrend.2015.122.
115. Huynh, M.L. Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis / M.L.Huynh, P.Russell, B.Walsh // *Methods Mol Biol.* - 2009. - Vol. 519. - P.507-13. DOI: 10.1007/978-1-59745-281-6_34.
116. International Helminth Genomes Consortium. Comparative genomics of the major parasitic worms / International Helminth Genomes Consortium // *Nat. Genet.* - 2019. - Vol. 51. - N 1. P.163–174. DOI: 10.1038/s41588-018-0262-1.
117. Izvekova, G.I. Digestion and digestive-transport surfaces in cestodes and their fish hosts / G.I.Izvekova, B.I.Kuperman, V.V.Kuz'mina // *Comp Biochem Physiol A Physiol.* - 1997. - Vol. 118. - N 4. - P.1165-71. DOI: 10.1016/s0300-9629(97)00040-6.
118. Izvekova, G.I. Localization of the proteinase inhibitor activity in the fish cestode *Eubothrium rugosum* / G.I.Izvekova, T.V.Frolova, E.I.Izvekov, E.N.Kashinskaya, M.M.Solovyev // *J Fish Dis.* - 2021. - Vol. 44. - N 12. - P.1951-1958. DOI: 10.1111/jfd.13508.
119. Izvekova, G.I. *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda, Pseudophyllidea): Final stages of carbohydrate metabolism / G.I.Izvekova // *Helminthologia.* - 2001. - Vol. 38. - N 1. - P.23-27.
120. Jolles, J.W. *Schistocephalus parasite* infection alters sticklebacks' movement ability and thereby shapes social interactions / J.W.Jolles, G.P.F.Mazué, J.Davidson, J.Behrmann-Godel, I.D.Couzin // *Sci Rep.* - 2020. - Vol. 10. - N 1. - P.12282. DOI: 10.1038/s41598-020-69057-0.

121. Kalle, M. Proteolytic activation transforms heparin cofactor II into a host defense molecule / M.Kalle, P.Papareddy, G.Kasetty, D.M.Tollefsen, M.Malmsten, M.Mörgelin, A.Schmidtchen // *J Immunol.* - 2013. - Vol. 190. - N 12. - P.6303–6310. DOI:10.4049/jimmunol.120303.
122. Kalyaanamoorthy, S. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates / S.Kalyaanamoorthy, B.Q.Minh, T.K.F.Wong, A.von Haeseler, L.SJermiin // *Nat Methods.* - 2017. - Vol. 14. - N 6. - P.587-589. DOI: 10.1038/nmeth.4285.
123. Kanehisa, M. New approach for understanding genome variations in KEGG / M.Kanehisa, Y.Sato, M.Furumichi, K.Morishima, M.Tanabe // *Nucleic Acids Res.* - 2019. - Vol. 47. - N D1. - P.D590-D595. DOI: 10.1093/nar/gky962.
124. Kashiide, T. Molecular and functional characterization of glucose transporter genes of the fox tapeworm *Echinococcus multilocularis* / T.Kashiide, S.Kikuta, M.Yamaguchi, T.Irie, H.Kouguchi, K.Yagi, J.Matsumoto // *Mol Biochem Parasitol.* - 2018. - Vol. 225. - P.7-14. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2018.08.004.
125. Kim, D.W. Transcriptome sequencing and analysis of the zoonotic parasite *Spirometra erinacei* spargana (plerocercoids) / D.W.Kim, W.G.Yoo, M.R.Lee, H.W.Yang, Y.J.Kim, S.H.Cho, W.J.Lee, J.W.Ju // *Parasit Vectors.* - 2014. - Vol. 7. - P.368. DOI: 10.1186/1756-3305-7-368.
126. Kim, J.H. Differential protein expression in *Spirometra erinacei* according to its development in its final host / J.H.Kim, Y.J.Kim, W.M.Sohn, Y.M.Bae, S.T.Hong, M.H.Choi // *Parasitol Res.* - 2009. - Vol. 105. - N 6. - P.1549-56. DOI: 10.1007/s00436-009-1585-8.
127. Kobayashi, Y. Quantification of major allergen parvalbumin in 22 species of fish by SDS-PAGE / Y.Kobayashi, T.Yang, C.T.Yu, C.Ume, H.Kubota, K.Shimakura, K.Shiomi, N.Hamada-Sato // *Food Chem.* - 2016. - Vol. 194. - P.345–353. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.037.
128. Kochneva, A. The first transcriptomic resource for the flatworm *Triaenophorus nodulosus* (cestoda: bothriocephalidea), a common parasite of holarctic freshwater fish / A.Kochneva, E.Borvinskaya, P.Drozdova // *Marine Genomics.* - 2019. - Vol. 46. - P.100702. DOI: 10.1016/j.margen.2019.100702.
129. Kochneva, A. Zone of interaction between the parasite and the host: protein profile of the body cavity fluid of *Gasterosteus aculeatus* L. infected with the cestode *Schistocephalus solidus* (Muller, 1776) / A.Kochneva, E.Borvinskaya, L.Smironov // *Acta Parasit.* - 2021. - Vol. 66. - P.569–583. DOI: 10.1007/s11686-020-00318-8.
130. Körting, W. Carbohydrate catabolism in the plerocercoids of *Schistocephalus solidus* (Cestoda: Pseudophyllidea) / W.Körting, J.Barrett // *Int. J. Parasitol.* - 1977. - Vol. 7. - P.411-417. DOI:10.1016/0020-7519(77)90067-4.

131. Koziol, U. Comparative analysis of Wnt expression identifies a highly conserved developmental transition in flatworms / U.Koziol, F.Jarero, P.Olson, K.Brehm // *BMC biology*. - 2016. - Vol. 14. - P.10. DOI:10.1186/s12915-016-0233-x.
132. Krautz-Peterson, G. Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host / G.Krautz-Peterson, M.Simoes, Z.Faghiri, D.Ndegwa, G.Oliveira, C.B.Shoemaker, P.J.Skelly // *PLoS Pathog.* - 2010. - Vol. 6. - N 6. - P.e1000932. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000932.
133. Kuchta, R. Invalidity of three Palaearctic species of *Triaenophorus tapeworms* (Cestoda: Pseudophyllidea): evidence from morphometric analysis of scolex hooks / R.Kuchta, R.Vlcková, L.G.Poddubnaya, A.Gustinelli, E.Dzika, T.Scholz // *Folia Parasitol (Praha)*. - 2007. - Vol. 54. - N 1. - P.34-42. DOI: 10.14411/fp.2007.005.
134. Kuehn, A. Important variations in parvalbumin content in common fish species: a factor possibly contributing to variable allergenicity / A.Kuehn, T.Scheuermann, C.Hilger, F.Hentges // *Int Arch Allergy Immunol.* - 2010. - Vol. 153. - N 4. - P.359–366. DOI: 10.1159/000316346.
135. Kuklina, M.M. The biochemical aspects of the relationship in the parasite-host system as exemplified by Kittiwake and cestodes from different systematic groups / M.M.Kuklina, V.V.Kuklin // *Dokl Biol Sci.* - 2011 - Vol. 438. - P.49-53. DOI: 10.1134/S001249661103001X.
136. Kutyrev, I.A. Prostaglandins E2 and D2-regulators of host immunity in the model parasite *Diphyllobothrium dendriticum*: An immunocytochemical and biochemical study / I.A.Kutyrev, N.M.Biserova, D.N.Olennikov, J.V.Korneva, O.E.Mazur // *Mol Biochem Parasitol.* - 2017. - Vol. 212. - P.33-45. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2017.01.006.
137. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K.Laemmli // *Nature* - 1970. - Vol. 227. - P.680–685.
138. Lafferty, K.D. How environmental stress affects the impacts of parasites / K.D.Lafferty, A.M.Kuris // *Limnol. Oceanogr.* - 1999. - Vol. 44. - N 3 (part 2). - P. 925–931.
139. Lagrue, C. Genetic structure and host–parasite co- divergence: evidence for trait- specific local adaptation / C.Lagrue, Joannes A., Poulin R., Blasco-Costa I. // *Biological Journal of the Linnean Society.* - 2016. - Vol. 118. - N 2. - P.344–358. DOI: 10.1111/bij.12722.
140. Lechner, M. Proteinortho: detection of (co-)orthologs in large-scale analysis / M.Lechner, S.Findeiss, L. Steiner, M.Marz, P.F.Stadler, S.J.Prohaska // *BMC Bioinformatics.* - 2011. - Vol. 12. - P.124. DOI: 10.1186/1471-2105-12-124.
141. Lee, R.Y. 2017. WormBase 2017: molting into a new stage / R.Y.Lee, K.L.Howie, T.W.Harris, V.Arnaboldi, S.Cain, J.Chan, W.J.Chen, P.Davis, S.Gao, C.Grove, R.Kishore // *Nucleic Acids Res.* - 2017. - Vol. 46. - N D1. - P.D869–D874. DOI:10.1093/nar/gkx998.

142. Leid, R.W. A superoxide dismutase of metacestodes of *Taenia taeniaeformis* / R.W.Leid, C.M.Suquet // Mol Biochem Parasitol. - 1986. - Vol. 18. - P.301–311.
143. Levron, C. Ultrastructure of the tegument of the cestode *Paraechinophallus japonicus* (Bothriocephalidea: Echinophallidae), a parasite of the bathypelagic fish *Psenopsis anomala* / C.Levron, L.G.Poddubnaya, R.Kuchta, M.Freeman, Y.H.Wang, T.Scholz // Invertebr Biol. - 2008. - Vol. 127. - N 2. - P.153–161. DOI: 10.1111/j.1744-7410.2007.00123.x
144. Li, Y. The serpin superfamily in channel catfish: identification, phylogenetic analysis and expression profiling in mucosal tissues after bacterial infections / Y.Li, S.Liu, Z.Qin, J.Yao, C.Jiang, L.Song, R.Dunham, Z.Liu // Dev Comp Immunol. - 2015. - Vol. 49. - N 2. - P.267–277. DOI:10.1016/j.dci.2014.12.006.
145. Liebau, E. Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis* / E.Liebau, V.Müller, R.Lucius, R.D.Walter, K.Henkle-Dührsen // Mol Biochem Parasitol. - 1996. - Vol. 77. - N 1. - P.49–56.
146. Liu, F. New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum* / F.Liu, J.Lu, W.Hu, S.Y.Wang, S.J.Cui, M.Chi, Q.Yan, X.R.Wang, H.D.Song, X.N.Xu, J.J.Wang, X.L.Zhang, X.Zhang, Z.Q.Wang, C.L.Xue, P.J.Brindley, D.P.McManus, P.Y.Yang, Z.Feng, Z.Chen, Z.G.Han // PLoS Pathog. - 2006. - Vol. 2. - N 4. - P.e29. DOI: 10.1371/journal.ppat.0020029.
147. Long, Y. *Angiostrongylus cantonensis* cathepsin B-like protease (Ac-cathB-1) is involved in host gut penetration / Y.Long, B.Cao, L.Yu, M.Tukayo, C.Feng, Y.Wang, D.Luo // Parasite. - 2015. - Vol. 22. - P.37. DOI: 10.1051/parasite/2015037.
148. Lubzens, E. Carotenoid and retinoid transport to fish oocytes and eggs: what is the role of retinol binding protein? / E.Lubzens, L.Lissauer, B.Levavi-Sivan, J.C.Avarre, M.Sammar // Mol Aspects Med. - 2003. - Vol. 24. - N 6. - P.441–457. DOI: 10.1016/s0098-2997(03)00040-2
149. Lumsden, R.D. Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. VII. Evidence for the function of the tegument glycocalyx in cation binding by *Hymenolepis diminuta* / R.D.Lumsden // J Parasitol. - 1973. - Vol. 59. - N 6. - P.1021-30.
150. Lumsden, R.D. Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. 3. Hydrolysis of phosphate esters / R.D.Lumsden, G.Gonzalez, R.R.Mills, J.M.Viles // J Parasitol. - 1968. - Vol. 54. - N 3. - P.524-35.
151. Lumsden, R.D. Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. VIII. Phosphohydrolase activity and cation adsorption in the tegument brush border of *Hymenolepis diminuta* / R.D.Lumsden, B. Berger // J Parasitol. - 1974. - Vol. 60. - N 5. - P.744-51.

152. Lumsden, R.D. The tapeworm tegument: a model system for studies on membrane structure and function in host-parasite relationships / R.D.Lumsden // *Trans Am Microsc Soc.* - 1975. - Vol. 94. - N 4. - P.501-7.
153. Lundgren, D.H. Role of spectral counting in quantitative proteomics / D.H.Lundgren, S.I.Hwang, L.Wu, D.K.Han // *Expert Rev Proteomics.* - 2010. - Vol. 7. - N 1. - P.39-53. DOI: 10.1586/epr.09.69.
154. Magdaleno, A. The involvement of glutamate metabolism in the resistance to thermal, nutritional, and oxidative stress in *Trypanosoma cruzi* / A.Magdaleno, B.Suárez Mantilla, S.C.Rocha, E.M.Pral, A.M.Silber // *Enzyme Res.* - 2011. - Vol. 2011. - P.486928. DOI: 10.4061/2011/486928.
155. McManus, D.P. Intermediary metabolism in parasitic helminths / D.P.McManus // *Int J Parasitol.* - 1987. - Vol. 17. - N 1. - P.79-95. DOI: 10.1016/0020-7519(87)90029-4.
156. Menzel, R. A systematic gene expression screen of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes reveals CYP35 as strongly xenobiotic inducible / R.Menzel, T.Bogaert, R.Achazi // *Arch Biochem Biophys.* - 2001. - Vol. 395. - N 2. - P.158-68. DOI: 10.1006/abbi.2001.2568.
157. Mettrick, D.F. Correlations between the amino acid pools of *Hymenolepis diminuta* and the rat intestine / D.F.Mettrick // *Can J Zool.* - 1975. - Vol. 53. - N 3. - P.320-31. DOI: 10.1139/z75-041.
158. Mettrick, D.F. Ecological and physiological aspects of helminth--host interactions in the mammalian gastrointestinal canal / D.F.Mettrick, R.B.Podesta // *Adv Parasitol.* - 1974. - Vol. 12. - N 83. - P.278. DOI: 10.1016/s0065-308x(08)60389-9.
159. Mettrick, D.F. Studies on the protein metabolism of cestodes. 2. Effect of free dietary amino acid supplements on the growth of *Hymenolepis diminuta* / D.F.Mettrick // *Parasitology.* - 1968. - Vol. 58. - N 1. - P.37-45. DOI: 10.1017/s003118200007339x.
160. Mettrick, D.F. Vitamin absorption in the in vivo intestine of normal and infected (*Hymenolepis diminuta*: Cestoda) rats / D.F.Mettrick, D.J.Jackson // *J Helminthol.* - 1979. - Vol. 53. - N 3. - P.213-22. DOI: 10.1017/s0022149x0000599x.
161. Molehin, A.J. Serine protease inhibitors of parasitic helminthes / A.J.Molehin, G.N.Gobert, D.P.McManus // *Parasitology.* - 2012. - Vol. 139. - N 6. - P.681–695. DOI: 10.1017/S0031 18201 10024 35.
162. Monteiro, K.M. Comparative proteomics of hydatid fluids from two *Echinococcus multilocularis* isolates / K.M.Monteiro, K.R.Lorenzatto, J.C.de Lima, G.B.Dos Santos, S.Förster, G.P.Paludo, P.C.Carvalho, K.Brehm, H.B.Ferreira // *J Proteomics.* - 2017. - Vol. 6. - P.162:40-51. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.04.009.

163. Monteiro, K.M. Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host / K.M.Monteiro, M.O.de Carvalho, A.Zaha, H.B.Ferreira // *Proteomics*. - 2010 - Vol. 10. - N10. - P.1985-99. DOI: 10.1002/pmic.200900506.
164. Munir, W.A. The metabolism of xenobiotic compounds by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea) / W.A.Munir, J.Barrett // *Parasitology*. - 1985. - Vol. 91. - Pt 1. - P.145-56. DOI: 10.1017/s0031182000056584.
165. Mustafa, T. Cytosolic glutamate dehydrogenase in adult *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) / T.Mustafa, R.Komuniecki, D.F.Mettrick // *Comp Biochem Physiol*. - 1978. - Vol. 61. - N 2. - P.219–222. DOI: 10.1016/0305-0491(78)90164-5.
166. Neves, S.R. G protein pathways / S.R.Neves, P.T.Ram, R.Iyengar // *Science*. - 2002. - Vol. 296. - P.1636–1639. DOI: 10.1126/science.1071550.
167. Nguyen, H.A. A novel sigma-like glutathione transferase of *Taenia solium* metacestode / H.A.Nguyen, Y.A.Bae, E.G.Lee, S.H.Kim, S.P.Diaz-Camacho, Y.Nawa, I.Kang, Y.Kong // *Int J Parasitol*. - 2010. - Vol. 40. - N 9. - P.1097-106. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.03.007.
168. Nicolao, M.C., Denegri GM, Cárcamo JG, Cumino AC. P-glycoprotein expression and pharmacological modulation in larval stages of *Echinococcus granulosus* / M.C.Nicolao, G.M.Denegri, J.G.Cárcamo, A.C.Cumino // *Parasitol Int*. - 2014. - Vol. 63. - N 1. - P.1-8. DOI: 10.1016/j.parint.2013.09.017.
169. Nie, A. Roles of aminoacyl tRNA synthetases in immune regulation and immune diseases / A.Nie, B.Sun, Z.Fu, Y.Dongsheng // *Cell Death Dis*. - 2019. - Vol. 10. - N 12. - P.901. DOI: 10.1038/s41419-019-2145-5.
170. O'Farrell, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins / P.H.O'Farrell // *J Biol Chem*. - 1975. - Vol 250. - N 10. - P.4007-21.
171. Oliveira, T. Crystal structure of NAD⁺-dependent *Peptoniphilus asaccharolyticus* glutamate dehydrogenase reveals determinants of cofactor specificity / T.Oliveira, S.Panjikar, J.B.Carrigan, M.Hamza, M.A.Sharkey, P.C.Engel, A.R.Khan // *J Struct Biol*. - 2012. - Vol. 177. - P.543–552. DOI: 10.1016/j.jsb.2011.10.006.
172. Olson, P.D. Interrelationships and evolution of the tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) / P.D.Olson, D.Timothy, J.Littlewood, R.A.Bray, J.Mariaux // *Mol Phylogenet Evol*. - 2001 - Vol. 19. - P.443–67.
173. Ong, J.L.Y. Molecular characterization of betaine-homocysteine methyltransferase 1 from the liver, and effects of aestivation on its expressions and homocysteine concentrations in the liver, kidney and muscle, of the *African lungfish*, *Protopterus annectens* / J.L.Y.Ong, J.M.Woo, K.C.Hiong, B.Ching, W.P.Wong, S.F.Chew, Y.K.Ip // *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. - 2015. - Vol. 183. - P.30–41. DOI: 10.1016/j.cbpb.2014.12.007.

174. Overli, O. Effects of *Schistocephalus solidus* infection on brain monoaminergic activity in female three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* / O.Overli, M.Páll, B.Borg, M.Jobling, S.Winberg // Proc Biol Sci. - 2001. - Vol. 268. - N 1474. - P.1411-1415. DOI:10.1098/rspb.2001.1668.
175. Pakharukova, M.Y. Cytochrome P450 in fluke *Opisthorchis felineus*: identification and characterization / M.Y.Pakharukova, N.I.Ershov, E.V.Vorontsova, A.V.Katokhin, T.I.Merkulova, V.A.Mordvinov // Mol Biochem Parasitol. - 2012. - Vol. 181. - N 2. - P.190-4. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2011.11.005.
176. Paludo, G.P. Cestode strobilation: prediction of developmental genes and pathways / G.P.Paludo, C.E.Thompson, K.N.Miyamoto, R.L.M.Guedes, A.Zaha, A.T.R.de Vasconcelos, M.Cancela, H.B.Ferreira // BMC Genomics. - 2020. - Vol. 21. - N 1. - P.487. DOI: 10.1186/s12864-020-06878-3.
177. Pan, W. Surveillance on the status of immune cells after *Echinococcus granulosus* protoscoleces infection in Balb/c mice / W.Pan, H.J.Zhou, Y.J.Shen, Y.Wang, Y.X.Xu, Y.Hu, Y.Y.Jiang, Z.Y.Yuan, C.E.Ugwu, J.P.Cao // PLoS One. - 2013. - Vol. 8. - N 3. - P.e59746. DOI: 10.1371/journal.pone.0059746.
178. Pan, W. Transcriptome profiles of the protoscoleces of *Echinococcus granulosus* reveal that excretory-secretory products are essential to metabolic adaptation / W.Pan, Y.Shen, X.Han, Y.Wang, H.Liu, Y.Jiang, Y.Zhang, Y.Wang, Y.Xu, J.Cao // PLoS Negl Trop Dis. - 2014. - Vol. 8. - N 12. - P.e3392. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003392.
179. Pappas, P.W. *Hymenolepis microstoma*: lactate and malate dehydrogenases of the adult worm / P.W.Pappas, L.L.Schroeder // Exp Parasitol. - 1979. - Vol. 47. - N 2. - P.134-9. DOI: 10.1016/0014-4894(79)90067-5.
180. Pappas, P.W. Membrane transport in helminth parasites: a review / P.W.Pappas // Exp Parasitol. - 1975. - Vol. 37. - N 3. - P.469-530. DOI: 10.1016/0014-4894(75)90016-8.
181. Pietrzak, S.M. Succinate decarboxylation to propionate and the associated phosphorylation in *Fasciola hepatica* and *Spirometra mansonioides* / S.M.Pietrzak, H.J.Saz // Mol Biochem Parasitol. - 1981. - Vol. 3. - N 1. - P.61-70. DOI: 10.1016/0166-6851(81)90078-5.
182. Polzer, M. Identification and partial characterization of the proteases from different developmental stages of *Schistocephalus solidus* (Cestoda: Pseudophyllidae) / M.Polzer, U.Conradt // Int J Parasitol. - 1994. - Vol. 24. - N 7. - P.967-73. DOI: 10.1016/0020-7519(94)90161-9.
183. Pompella, A. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist / A.Pompella, A.Visvikis, A.Paolicchi, V.de Tata, A.F.Casini // Biochem Pharmacol. - 2003. - Vol. 66. - P.1499-503.
184. Prakash, P. Structural basis for the catalytic mechanism and α -ketoglutarate cooperativity of glutamate dehydrogenase / P.Prakash, N.S.Punekar, P.Bhaumik // J Biol Chem. - 2018. - Vol. 293. - P.6241-6258. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000149.

185. Precious, W.Y. Xenobiotic metabolism in helminths / W.Y.Precious, J.Barrett // *Parasitol Today*. - 1989 - Vol. 5. - N 5. - P.156-60. DOI: 10.1016/0169-4758(89)90080-x.
186. Protasio, A.V. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni* / A.V.Protasio, I.J.Tsai, A.Babbage, S.Nichol, M.Hunt, M.A.Aslett, N.De Silva, G.S.Velarde, T.J.Anderson, R.C.Clark, C.Davidson, G.P.Dillon, N.E.Holroyd, P.T.LoVerde, C.Lloyd, J.McQuillan, G.Oliveira, T.D.Otto, S.J.Parker-Manuel, M.A.Quail, R.A.Wilson, A.Zerlotini, D.W.Dunne, M.Berriman // *PLoS Negl Trop Dis*. - 2012. - Vol. 6. - N 1. - P.e1455. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001455.
187. Read, C.P Some physiological and biochemical aspects of host-parasite relations / C.P.Read // *J Parasitol*. - 1970. - Vol. 56. - N 4. - P.643-52.
188. Read, C.P. Biochemistry and physiology of tapeworms / C.P.Read, J.E.Jr.Simmons // *Physiol Rev*. - 1963. - Vol. 43. - P.263-305. DOI: 10.1152/physrev.1963.43.2.263.
189. Ritchie, M. E. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies / M.E.Ritchie, B.Phipson, D.Wu, Y.Hu, C.W.Law, W.Shi, G.K.Smyth // *Nucleic Acids Res*. - 2015. - Vol.43. - P.e47. DOI:10.1093/nar/gkv007.
190. Robinson, M.W. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host/ M.W Robinson, R.Menon, S.M.Donnely, J.P.Dalton, S.Ranganathan // *Molecular and Cellular Proteomics*. - 2009. - Vol .8. - N 8. - P.1891—1907.
191. Rogozhin, E.A. Isolation and partial structural characterization of new Kunitz-type trypsin inhibitors from the pike cestode *Triaenophorus nodulosus* / E.A.Rogozhin, M.M.Solovyev, T.V.Frolova, G.I.Izvekova // *Mol Biochem Parasitol*. - 2019. - Vol. 233. - P.111217. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2019.111217.
192. Russell, M.J. Angiotensin signaling and receptor types in teleost fish / M.J.Russell, A.M.Klemmer, K.R.Olson // *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. - 2001. - Vol. 128. - N 1. - P.41–51. DOI:10.1016/s1095 -6433(00)00296 -8.
193. Sako, Y. *Echinococcus multilocularis*: identification and functional characterization of cathepsin B-like peptidases from metacestode / Y.Sako, K.Nakaya, A.Ito // *Exp Parasitol*. - 2011. - Vol. 127. - N 3. - P.693-701. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.11.005.
194. Sako, Y. Recent advances in serodiagnosis for cysticercosis / Y.Sako, A.Ito // *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. - 2001. - Vol. 32. - Suppl 2. - P.98-104.
195. Salinas, G. *Echinococcus granulosus*: cloning of a thioredoxin peroxidase / G.Salinas, V.Fernández, C.Fernández, M.E.Selkirk // *Exp Parasitol*. - 1998. - Vol. 90. - P.298–301.
196. Salinas, G. *Echinococcus granulosus*: heterogeneity and differential expression of superoxide dismutases / G.Salinas, S.Cardozo // *Exp Parasitol*. - 2000. - Vol. 94. - P.56–59.

197. Samoil, V. Vesicle-based secretion in schistosomes: Analysis of protein and microRNA (miRNA) content of exosome-like vesicles derived from *Schistosoma mansoni* / V.Samoil, M.Dagenais, V.Ganapathy, J.Aldridge, A.Glebov, A.Jardim, P.Ribeiro // *Sci Rep.* - 2018. - Vol. 8. - N 1. - P.3286. DOI: 10.1038/s41598-018-21587-4.
198. Santos, G.B. Excretory/secretory products in the *Echinococcus granulosus* metacestode: is the intermediate host complacent with infection caused by the larval form of the parasite? / G.B.Santos, K.M.Monteiro, E.D.da Silva, M.E.Battistella, H.B.Ferreira, A.Zaha // *Int J Parasitol.* - 2016. - Vol. 46. - N 13-14. - P.843-856. DOI: 10.1016/j.ijpara.2016.07.009 .
199. Schappi, J.M. Tubulin, actin and heterotrimeric G proteins: coordination of signaling and structure / J.M.Schappi, A.Krbanjevic, M.M.Rasenick// *Biochim. Biophys. Acta.* - 2014. - Vol. 1838. - N 2. - P.674–681. DOI: 10.1016/j. bbamem.2013.08.026.
200. Schjørring, S. *Schistocephalus solidus*: a molecular test of premature gamete exchange for fertilization in the intermediate host *Gasterosteus aculeatus* / S.Schjørring, A.Lüscher // *Exp Parasitol.* - 2003. - Vol. 103. - N 3-4. - P.174-6. DOI: 10.1016/s0014-4894(03)00092-4.
201. Scholz, T. A digest of fish tapeworms / T.Scholz, R.Kuchta // *Vie et Milieu.* - 2017. - Vol. 67. - N 2. - P. 43–58.
202. Sekito, A. DJ-1 interacts with HIPK1 and affects H₂O₂-induced cell death / A.Sekito, S.Koide-Yoshida, T.Niki, T.Taira, S.M.Iguchi-Ariga, H.Ariga // *Free Radic Res.* 2006. - Vol. 40. - N 2. - P.155–165. DOI: 10.1080/10715 76050 04568 47.
203. Shawa, P.E. Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription / P.E.Shawa // *EMBO Rep.* - 2002. - Vol. 3. - N 6. - P.521–526. DOI: 10.1093/embo-reports/kvf11 8.
204. Sheehan, D. 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily / D.Sheehan, G.Meade, V.M.Foley, C.A.Dowd // *Biochemical Journal.* - 2001. - Vol. 15. - Pt 1.- P.1–16.
205. Smith, P.K. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* / P.K.Smith, R.I.Krohn, G.T.Hermanson, A.K.Mallia, F.H.Gartner, M.D.Provenzano, E.K.Fujimoto, N.M.Goeke, B.J.Olson, D.C.Klenk // *Anal Biochem.* – 1985. – Vol. 150/ - № 1. P.76-85. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
206. Smyth, J. D. The physiology and biochemistry of cestodes / J.D.Smyth, D.P.McManus. - Cambridge: Cambridge University Press, 2007. - 398 p.
207. Smyth, J.D. Parasitological serendipity: from *Schistocephalus* to *Echinococcus* / J.D.Smyth // *Int J Parasitol.* - 1990. - Vol. 20. - N 4. - P.411-23. DOI: 10.1016/0020-7519(90)90190-x.
208. Smyth, J.D. Studies on tapeworm physiology, the cultivation of *Schistocephalus solidus* in vitro / J.D.Smyth // *J Exp Biol.* - 1946. - Vol. 23. - N 1. - P.47-70.

209. Smyth, J.D. Studies on tapeworm physiology. V. Further observations on the maturation of *Schistocephalus solidus* (Diphyllobothriidae) under sterile conditions in vitro / J.D.Smyth // J Parasitol.- 1950. - Vol. 36. - N 4. - P. 371-83.
210. Smyth, J.D. Studies on tapeworm physiology. VI. Effect of temperature on the maturation in vitro of *Schistocephalus solidus* / J.D.Smyth // The Journal of Experimental Biology. - 1952. - Vol. 29. - P. 304–309.
211. Smyth, J.D. Studies on tapeworm physiology. VII. Fertilization of *Schistocephalus solidus* in vitro / J.D.Smyth // Exp Parasitol. - 1954. - Vol. - 3. - N 1. P.64-7. DOI: 10.1016/0014-4894(54)90019-3.
212. Song, X. Characterization of a Secretory Annexin in *Echinococcus granulosus* / X.Song, D.Hu, X.Zhong, N.Wang, X.Gu, T.Wang, X.Peng, G.Yang // Am J Trop Med Hyg. - 2016. - Vol. 94. - N 3. - P.626-33. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0452.
213. Srinivasan, L. Biochemical studies on glutathione S-transferase from the bovine filarial worm *Setaria digitata* / L.Srinivasan, N.Mathew, T.Karunan, K.Muthuswamy // Parasitol Res. - 2011. - Vol. 109. - N 1. - P.213-9. DOI: 10.1007/s00436-010-2227-x.
214. Sripa, B. Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis / B.Sripa, S.Kaewkes // International Journal for Parasitology. - 2000. - Vol. 30. - P.735-740.
215. Stacklies, W. pcaMethods – a Bioconductor package providing PCA methods for incomplete data / W. Stacklies, H. Redestig, M. Scholz, D. Walther, J. Selbig // Bioinformatics. – 2007. – Vol. 23. – P.1164–1167.
216. Storm, J. *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase a is dispensable and not a drug target during erythrocytic development / J.Storm, J.Perner, I.Aparicio, E.M.Patzewitz, K.Olszewski, M.Llinas, P.C.Engel, S.Müller // Malar J. - 2011. - Vol. 10. - P.193. DOI: 10.1186/1475-2875-10-193.
217. Sulima, A., Bień J., Savijoki K., Näreaho A., Sałamatin R., Conn D.B., Młocicki D. Identification of immunogenic proteins of the cysticercoid of *Hymenolepis diminuta* / A.Sulima, J.Bień, K.Savijoki, A.Näreaho, R.Sałamatin, D.B.Conn, D.Młocicki // Parasit Vectors. - 2017. - Vol. 10. - N 1. - P.577. DOI: 10.1186/s13071-017-2519-4.
218. Suomi, T. ROTS: an R package for reproducibility-optimized statistical testing / T.Suomi, F.Seyednasrollah, M. K.Jaakkola, T.Faux, L.L.Elo // PLoS Comput. Biol. - 2017. - Vol.13. - P. e1005562. DOI:10.1371/journal.pcbi.1005562.
219. Tararam, C.A. *Schistosoma mansoni* annexin 2: molecular characterization and immunolocalization / C.A.Tararam, L.P.Farias, R.A.Wilson, L.C.de Cerqueira Leite// Exp Parasitol. - 2010. - Vol. 126. - P.146–155. DOI: 10.1016/j.exppara.2010.04.008.

220. Terenina, N.B. Serotonin, reserpine, and motility in *Mesocestoides tetrahyridia*. An experimental spectrofluorometry and immunocytochemistry study / N.B.Terenina, M.K.Gustafsson, M.Reuter // Parasitol Res. - 1995. - Vol. 81. - N 8. - P.677-83. DOI: 10.1007/BF00931846.
221. Terenina, N.B. The New Data on the Serotonin and FMRFamide Localization in the Nervous System of *Opisthorchis felineus* Metacercaria / N.B.Terenina, N.D.Kreshchenko, N.V.Mochalova, D.Nefedova, E.L.Voropaeva, S.O.Movsesyan, A.Demiaszkiewicz, V.A.Yashin, A.V.Kuchin // Acta Parasitol. - 2020. - Vol. 65. - N 2. - P.361-374. DOI: 10.2478/s11686-019-00165-2.
222. Touil-Boukoffa, C. Production of nitric oxide (NO) in human hydatidosis: relationship between nitrite production and interferon-gamma levels / C.Touil-Boukoffa, B.Bauvois, J.Sancéau, B.Hamrioui, J.Wietzerbin // Biochimie. - 1998. - Vol. 80. - N 8-9. - P.739-44. DOI: 10.1016/s0300-9084(99)80027-3.
223. Tsai, I.J. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism / I.J.Tsai, M.Zarowiecki, N.Holroyd, A.Garciarrubio, s A.Sánchez-Flore, K.L.Brooks, A.Tracey, R.J.Bobes, G.Fragoso, E.Sciutto, M.Aslett, H.Beasley, H.M.Bennett, X.Cai, F.Camicia, R.Clark, M.Cucher, N.De Silva, T.A.Day, P.Deplazes, K.Estrada, C.Fernández, P.W.H.Holland, J.Hou, S.Hu, T.Huckvale, S.S.Hung, L.Kamenetzky, J.A.Keane, F.Kiss, U.Koziol, O.Lambert, K.Liu, X.Luo, Y.Luo, N.Macchiaroli, S.Nichol, J.Paps, J.Parkinson, N.Pouchkina-Stantcheva, N.Riddiford, M.Rosenzvit, G.Salinas, J.D.Wasmuth, M.Zamanian, Y.Zheng, Taenia solium Genome Consortium, J.Cai, X.Soberón, P.D.Olson, J.P.Laclette, K.Brehm, M.Berriman // Nature. - 2013. - Vol. 496. - N 7443. - P.57-63. DOI: 10.1038/nature12031.
224. Tutar, L. Heat shock proteins; an overview / L.Tutar, Y.Tutar // Curr Pharm Biotechnol. - 2010. - Vol. 11. - N 2. - P.216-22. DOI: 10.2174/138920110790909632.
225. Tyanova, S. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data / S. Tyanova, T. Temu, P. Sinitcyn, A. Carlson, M. Y. Hein, T. Geiger, M. Mann, J. Cox // Nature methods. – 2016. – Vol. 13. – N 9. - P.731–740. DOI: 10.1038/nmeth.3901.
226. Välikangas, T. A comprehensive evaluation of popular proteomics software workflows for label-free proteome quantification and imputation / T.Välikangas, T.Suomi, L.L.Elo // Brief Bioinform. - 2018. - Vol. 19. - N 6. - P.1344-1355. DOI: 10.1093/bib/bbx054.
227. Van Putten, W.F. Host-related genetic differentiation in the anther smut fungus *Microbotryum violaceum* in sympatric, parapatric and allopatric populations of two host species *Silene latifolia* and *S. dioica* / W.F.Van Putten, A.Biere, J.M.M.Van Damme // J. Evol. Biol. - 2005. - Vol. 18. - N 1. - P. 203–212. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2004.00771.x.

228. Vargas-Parada, L. Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (cestoda) / L.Vargas-Parada, C.F.Solis, J.P.Laclette // Parasitology. - 2001. - Vol. 122. - P.583–588. DOI: 10.1017/s0031182001007764.
229. Vaudel, M. PeptideShaker enables reanalysis of MS-derived proteomics data sets / M. Vaudel, J. M. Burkhardt, R. P. Zahedi, E. Oveland, F. S. Berven, A. Sickmann, L. Martens, H. Barsnes // Nat Biotechnol. – 2015. – Vol. 33. – P.22–24. DOI:10.1038/nbt.3109.
230. Vaudel, M. SearchGUI: An open-source graphical user interface for simultaneous OMSSA and X!Tandem searches / M.Vaudel, H.Barsnes, F.S.Berven, A.Sickmann, L.Martens // Proteomics. – 2011. – Vol. 11. - № 5. – P.996-9. DOI: 10.1002/pmic.201000595.
231. Venold, F.F. Intestinal fatty acid binding protein (fabp2) in Atlantic salmon (*Salmo salar*): localization and alteration of expression during development of diet induced enteritis / F.F.Venold, M.H.Penn, J.Thorsen, J.Gu, T.M.Kortner, A.Krogdahl, A.M.Bakke // Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. - 2013. - Vol. 164. - N 1. - P.229–240. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.09.009.
232. Vibanco-Pérez, N. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium* / N.Vibanco-Pérez, L.Jiménez, G.Mendoza-Hernández, A.Landa // Parasitol Res. - 2002. - Vol. 88. - N 5. - P.398-404. DOI: 10.1007/s00436-001-0580-5.
233. Vibanco-Pérez, N. Glutathione S-transferase in helminth parasites / N.Vibanco-Pérez, A.Landa-Piedra // Revista Latinoamericana de Microbiología. - 1998.- Vol. 40. - P. 73–85.
234. Victor, B. Proteomic analysis of *Taenia solium* metacestode excretion–secretion proteins / B.Victor, K.Kanobana, S.Gabrie, K.Polman, N.Deckers, P.Dorny, A.M.Deelder, M.Palmblad // Proteomics. - 2012. - Vol. 12. - P. 1860–1869. DOI: 10.1002/pmic.201100496.
235. Viswanathan, S. Two-dimensional difference gel electrophoresis / S.Viswanathan, M.Unlü, J.S.Minden // Nat Protoc. – 2006. – Vol 1. – № 3. P.1351-8. DOI: 10.1038/nprot.2006.234
236. Vysotskaya, R.U. Lysosomal enzymes in adaptive responses of cestodes of the genus *Triaenophorus* / R.U.Vysotskaya, E.P.Ieshko, M.Yu. Krupnova, L.V.Anikieva, D.I.Lebedeva // Parazitologiya. – 2021. – Vol. 55. – No 2. – P. 91-100. – DOI 10.31857/S0031184721020010.
237. Waeschenbach, A. Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with large fragments of mtDNA / A.Waeschenbach, B.L.Webster, D.T.Littlewood // Mol. Phylogenet. Evol. - 2012. - Vol. 63. - N 3. - P.834–847. DOI:10.1016/j.ympev.2012.02.020.
238. Walker, J. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum* / J.Walker, P.Crowley, A.D.Moreman, J.Barrett // Mol Biochem Parasitol. - 1993. - Vol. 61. - N 2. - P.255-64. DOI: 10.1016/0166-6851(93)90071-5.

239. Wang, H. Molecular cloning and expression analysis of coagulation factor VIII and plasminogen involved in immune response to GCRV, and immunity activity comparison of grass carp *Ctenopharyngodon idella* with different viral resistance / H.Wang, C.Ding, J.Wang, X.Zhao, S.Jin, J.Liang, H.Luo, D.Li, R.Li, Y.Li, T.Xiao // *Fish Shellfish Immunol.* - 2019. - Vol. 86. - P.794–804. DOI:10.1016/j.fsi.2018.12.024.
240. Wang, Y. *Echinococcus multilocularis*: Proteomic analysis of the protoscoleces by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry / Y.Wang, Z.Cheng, X.Lu, C.Tang // *Exp Parasitol.* - 2009. - Vol. 123. - N 2. - P. 162-7. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.06.014.
241. Whyte, J.J. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure / J.J.Whyte, R.E.Jung, C.J.Schmitt, D.E.Tillitt // *Critical reviews in toxicology.* - 2000. - Vol. 30. - N 4. - P. 347-570.
242. Wu, M. Expression, Tissue Localization and Serodiagnostic Potential of *Echinococcus granulosus* Leucine Aminopeptidase / M.Wu, M.Yan, J.Xu, Y.Liang, X.Gu, Y.Xie, B.Jing, W.Lai, X.Peng, G.Yang // *Int J Mol Sci.* - 2018. - Vol. 19. - N 4. - P.1063. DOI: 10.3390/ijms19041063.
243. Yan, H.B. Genome-wide analysis of regulatory proteases sequences identified through bioinformatics data mining in *Taenia solium* / H.B.Yan, Z.Z.Lou, L.Li, P.J.Brindley, Y.Zheng, X.Luo, J.Hou, A.Guo, W.Z.Jia, X.Cai // *BMC Genomics.* - 2014. - Vol. 4. - N 15. - P.428. DOI: 10.1186/1471-2164-15-428.
244. Yang, Y. Serine proteases of parasitic helminths / Y.Yang, Yj.Wen, Y.N.Cai, I.Vallée, P.Boireau, M.Y.Liu, SP.Cheng // *Korean J Parasitol.* - 2015. - Vol. 53. - N 1. - P.1-11. DOI: 10.3347/kjp.2015.53.1.1.
245. Young, N.D. Whole-genome sequence of *Schistosoma haematobium* / N.D.Young, A.R.Jex, B.Li, Liu S., L.Yang, Z.Xiong, Y.Li, C.Cantacessi, R.S.Hall, X.Xu, F.Chen, X.Wu, A.Zerlotini, G.Oliveira, A.Hofmann, G.Zhang, X.Fang, Y.Kang, B.E.Campbell, A.Loukas, S.Ranganathan, D.Rollinson, G.Rinaldi, P.J.Brindley, H.Yang, J.Wang, J.Wang, R.B.Gasser // *Nat Genet.* - 2012. - Vol. 44. - N 2. - P.221–225. DOI: 10. 1038/ ng. 1065.
246. Yu, J.Z. Cytosolic G {alpha} s acts as an intracellular messenger to increase microtubule dynamics and promote neurite outgrowth / J.Z.Yu, R.H.Dave, J.A.Allen, T.Sarma, M.M.Rasenick // *J. Biol. Chem.* - 2009. - Vol. 284. - N 16. - P.10462–10472. doi: 10.1074/jbc.M809166200.
247. Žárský, V. Evolutionary loss of peroxisomes--not limited to parasites / V.Žárský, J.Tachezy // *Biol Direct.* - 2015. - Vol. 10. - P.74. DOI: 10.1186/s13062-015-0101-6.
248. Zhang, W. *Echinococcus granulosus* genomics: a new dawn for improved diagnosis, treatment, and control of echinococcosis / W.Zhang, S.Wang, D.P.McManus // *Parasite.* - 2014. - Vol. 21. - P.66. DOI: 10.1051/parasite/2014066.

249. Zhang, W. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis / W.Zhang, D.P.McManus // FEMS Immunol Med Microbiol. - 2006. - Vol. 47. - P.24–41.
250. Zheng, H. The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus* / H.Zheng, W.Zhang, L.Zhang, Z.Zhang, J.Li, G.Lu, Y.Zhu, Y.Wang, Y.Huang, J.Liu, H.Kang, J.Chen, L.Wang, A.Chen, S.Yu, Z.Gao, L.Jin, W.Gu, Z.Wang, L.Zhao, B.Shi, H.Wen, R.Lin, M.K.Jones, B.Brejova, T.Vinar, G.Zhao, D.P.McManus, Z.Chen, Y.Zhou, S.Wang // Nat Genet. - 2013. - Vol. 45. - N 10. - P.1168-75. DOI: 10.1038/ng.2757.
251. Zheng, Y. Phyletic distribution of fatty acid-binding protein genes / Y.Zheng, D.Blair, J.Bradley // PLoS ONE. - 2013. - Vol. 8. - N 10. - P.e77636. DOI: 10.1371/journal.pone.0077636.
252. Zi, M. Involvement of cystatin C in immunity and apoptosis / M.Zi, Y.Xu // Immunol Lett. - 2018. - Vol. 196. - P.80–90. DOI: 10.1016/j.imlet.2018.01.006.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

Рисунок 1 - Филогенетическое древо цестод на основе белковых последовательностей 70 ортологов. Страница 43.

Рисунок 2 - Анализ интенсивности окраски белковых пятен на DIGE-электрофореграммах *T. nodulosus* и *T. crassus*. А – Результаты анализа методом главных компонент содержания белков *Triaenophorus* spp. Б – Тепловая карта содержания идентифицированных белков *T. nodulosus* и *T. crassus* (в % от самого высокого значения на конкретной жизненной стадии), содержание которых постепенно изменяется по мере удаления от сколекса паразита. Страница 45.

Рисунок 3 - Репрезентативные DIGE-электрофореграммы белков *T. crassus* и *T. nodulosus* после визуализации красителя и присвоения псевдоцветов. А - сколексы (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) плероцеркоидов *T. crassus*; Б – сколексы (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) плероцеркоидов *T. nodulosus*; В – сколексы (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. crassus*; Г – сколексы (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. nodulosus*; Д - сколексы (красный) и зрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. crassus*; Е – сколексы (красный) и зрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. nodulosus*; Ж – зрелые (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. crassus*; З – зрелые (красный) и незрелые проглоттиды (голубой) взрослых *T. nodulosus*. Страница 46.

Рисунок 4 - Репрезентативные DIGE-электрофореграммы белков *T. crassus* и *T. nodulosus* после визуализации красителей и присвоения псевдоцветов. А – сколексы взрослых (красный) и плероцеркоидов (голубой) *T. crassus*; Б – сколексы взрослых (красный) и плероцеркоидов (голубой) *T. nodulosus*; В - незрелые проглоттиды взрослых (красный) и плероцеркоидов (голубой) *T. crassus*; Г – незрелые проглоттиды взрослых (красный) и плероцеркоидов (голубой) *T. nodulosus*. Страница 48.

Рисунок 5 - Репрезентативная 2D-электрофореграмма водорастворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus*, на которой отмечены белковые пятна, значимо различающиеся по оптической плотности при сравнении плероцеркоидов из различных хозяев. Страница 50.

Рисунок 6 - Оптическая плотность некоторых белковых пятен на 2D-электрофореграммах водорастворимых белков плероцеркоидов *T. nodulosus* из разных видов вторых промежуточных хозяев: а – различия статистически значимы по сравнению с плероцеркоидами из окуня (p-value <0.05); б – различия статистически значимы по сравнению с плероцеркоидами из ерша (p-value <0.05). Страница 51.

Рисунок 7 - Изображения области пятна (обведены синей линией), содержащего β -тубулин, на электрофореграммах белков плероцеркоидов *T. nodulosus* из различных вторых промежуточных хозяев. Страница 52.

Рисунок 8 - Качественные и количественные изменения протеомов инвазионных плероцеркоидов и половозрелых червей *S. solidus*. А - Диаграмма Венна представляет собой перекрытие списков белков, которые значимо различаются по содержанию при сравнении опытных групп *S. solidus* с контрольной. Голубой цвет («связанные с нагреванием») - белки, различающиеся по содержанию у паразитов, инкубированных при 40° С в течение 48 часов (взрослые черви), и плероцеркоидов без нагревания. Желтый цвет («не связанные с нагреванием») - белки, различающиеся по содержанию у паразитов, инкубированных при 22° С в течение 48 часов, и плероцеркоидов без нагревания. Зеленый цвет группами («связанные с газовым составом/составом среды») - белки, различающиеся по содержанию у паразитов всех экспериментальных групп. Б - Тепловая карта белков *S. solidus*, инкубированных при 40° С (взрослые черви), содержание которых значимо изменялось по сравнению с инвазионными плероцеркоидами без инкубации. Страница 55.

Рисунок 9 - Основные метаболические модули и пути KEGG [123], к которым относятся белки *S. solidus*, значимо различающиеся по содержанию у червей, инкубированных при 40°С (взрослые черви), по сравнению с инвазионными плероцеркоидами (контрольная группа). Страница 61.

Рисунок 10 - Схема пути гликолиза/гликогенолиза, на которой выделены белки с повышенным содержанием у взрослых червей *S. solidus* по сравнению с инвазионными плероцеркоидами. Зеленым цветом отмечены ферменты, содержание которых повышено у паразитов, инкубированных при 40° С в течение 48 часов (взрослые черви), по сравнению с инвазионными плероцеркоидами (контрольная группа, без инкубации). Голубым цветом отмечены белки, содержание которых было повышено как у червей, инкубированных как при 40°С, так и при 22°С, по сравнению с инвазионными плероцеркоидами (контрольная группа, без инкубации). Страница 64.

Рисунок 11 - Тепловая карта белков смывов из полости тела *G. aculeatus*, содержание которых значимо различалось при сравнении образцов зараженных и незараженных рыб. Изменение цвета кластера от зеленого до красного отражает увеличение содержания белка. Страница 67.

Таблица 1 - Описание образцов плероцеркоидов *S. solidus*. Страница 35.

Таблица 2 - Описание образцов смывов с поверхности тела *S. solidus* и целомической полости колюшки трехиглой *G. aculeatus*. Страница 40.

Таблица 3 - Идентифицированные масс-спектрометрическим методом белки различных отделов тела цестод *T. nodulosus* и *T. crassus*. Приложение.

Таблица 4 - Белки инвазионных плероцеркоидов и взрослых червей *S. solidus*, для которых выявлены качественные и количественные различия, согласно анализу протеома (наши данные), и соответствующие им транскрипты [104]. Страница 56.

Таблица 5 - Идентифицированные белки колюшки *G. aculeatus*, содержание которых достоверно различалось в смывах из полости тела зараженных и незараженных рыб. Приложение.

Таблица 6 - Белки *S. solidus*, обнаруженные в смывах зараженных особей трехиглой колюшки *G. aculeatus* и в смывах с покровов тела инвазионных плероцеркоидов паразита. Приложение.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 3 - Идентифицированные масс-спектрометрическим методом белки различных отделов тела цестод *T. nodulosus* и *T. crassus*.

Название белка	Нуклеотидная последовательность <i>T. nodulosus</i> , соответствующая белку (BioProject PRJNA526283)	ID белка (UniprotKB)	Термины Gene Ontology [42]
Неохарактеризованный белок	TRINITY_DN24645_c1_g1_i11		
Тропомиозин 2	TRINITY_DN22176_c0_g1_i15	A0A158QUY8	
Миозин, легкая цепь	TRINITY_DN20660_c0_g1_i1	W6UMY5	DNA duplex unwinding [GO:0032508]; sarcomere organization [GO:0045214]; DNA replication [GO:0006260]; ventricular cardiac myofibril development [GO:0055005]; positive regulation of heart contraction [GO:0045823]; atrial cardiac myofibril development [GO:0055004]; calcium ion binding [GO:0005509]; ATP binding [GO:0005524]; ATP-dependent 5'-3' DNA helicase activity [GO:0043139]
Парамиозин	TRINITY_DN23987_c0_g2_i3	A0A068YCY6	peptidyl-histidine phosphorylation [GO:0018106]; myofibril [GO:0030016]; myosin filament [GO:0032982]; protein histidine kinase activity [GO:0004673]; aspartate ammonia-lyase activity [GO:0008797]; ATP binding [GO:0005524]; 2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase activity [GO:0004113]; motor activity [GO:0003774]; actin binding [GO:0003779]
Актин	TRINITY_DN24030_c1_g1_i1	A0A183SVY0	cytoskeleton [GO:0005856]; cytoplasm [GO:0005737]; ATP binding [GO:0005524]

Миозин, тяжелая цепь	TRINITY_DN24463_c0_g2_i1	A0A0158QSF0	metabolic process [GO:0005975]; myosin complex [GO:0016459]; actin binding [GO:0003779]; ATP binding [GO:0005524]
Трансформирующий фактор роста, бета-индуцированный (Transforming growth factor-beta-induced protein, TGFBI)	TRINITY_DN20520_c0_g2_i1	A0A0R3VSY9	
Тубулин, β-цепь		A0A068WLA0	cytoskeleton organization [GO:0007010]; microtubule-based process [GO:0007017]; microtubule [GO:0005874]; structural constituent of cytoskeleton [GO:0005200]; nucleotide binding [GO:0000166]; GTP binding [GO:0005525]; GTPase activity [GO:0003924]
Пропионил-КоА карбоксилаза		A0A183TLF3	metabolic process [GO:0005975]; mitochondrial matrix [GO:0005759]; metal ion binding [GO:0046872]; ATP binding [GO:0005524]; biotin carboxylase activity [GO:0004075]; enzyme binding [GO:0019899]; propionyl-CoA carboxylase activity [GO:0004658]
Глутаматдегидрогеназа		A0A0R3UF23	cellular amino acid metabolic process [GO:0006520]; oxidoreductase activity [GO:0016491], acting on the CH-NH2 group of donors, NAD or NADP as acceptor [GO:0016639]
Major vault protein	TRINITY_DN24620_c2_g1_i1	A0A0R3UF02	eye development [GO:0001654]; brain development [GO:0007420]; negative regulation of signaling [GO:0023057]; protein activation cascade [GO:0072376]; negative regulation of protein autophosphorylation [GO:0031953]; negative regulation of protein tyrosine kinase activity [GO:0061099]; cell proliferation [GO:0008283]; cytoskeleton [GO:0005856]; extracellular vesicular exosome [GO:0070062]; perinuclear region of cytoplasm

[GO:0048471]; ribonucleoprotein complex [GO:1990904];
nucleus [GO:0005634]; protein phosphatase binding
[GO:0019903]; protein kinase binding [GO:0019901]

Таблица 5 - Идентифицированные белки колюшки *G. aculeatus*, содержание которых достоверно различалось в смывах из полости тела зараженных и незараженных рыб.

ID белка (UniprotKB)	Название белка	Изменение содержания белка в смывах зараженных рыб по сравнению с незараженными	Термины Gene ontology [42]
G3P5J3	Ангиотензин 1-10	Повышение	extracellular space [GO:0005615]; regulation of systemic arterial blood pressure by renin-angiotensin [GO:0003081]
G3PK17	Антитромбин-III (СерпинС1)	Повышение	extracellular space [GO:0005615]; heparin binding [GO:0008201]; serine-type endopeptidase inhibitor activity [GO:0004867]; cellular response to estrogen stimulus [GO:0071391]; regulation of blood coagulation, intrinsic pathway [GO:2000266]
G3Q4H0	Компонент комплемента с3а	Повышение	extracellular space [GO:0005615]; endopeptidase inhibitor activity [GO:0004866]; complement activation [GO:0006956]
G3PTJ2	Компонент комплемента С9	Повышение	membrane attack complex [GO:0005579]; cellular response to estrogen stimulus [GO:0071391]; immune response [GO:0006955]
G3PFW1	Креатинкиназа	Снижение	ATP binding [GO:0005524]; creatine kinase activity [GO:0004111]; phosphocreatine biosynthetic process [GO:0046314]
G3NQ86	Белок, содержащий домен цистатина	Повышение	cysteine-type endopeptidase inhibitor activity [GO:0004869]

G3NGS6	Белок-связывающий жирные кислоты 11a	Снижение	lipid binding [GO:0008289]; eye development [GO:0001654]
G3NPZ4	Белок-связывающий жирные кислоты 3	Снижение	lipid binding [GO:0008289]; chordate embryonic development [GO:0043009]; heart looping [GO:0001947]
G3Q1L3	Фруктоз-бифосфат альдолаза	Снижение	fructose-bisphosphate aldolase activity [GO:0004332]; glycolytic process [GO:0006096]
G3NRP8	Белок, содержащий Нсу-связывающий домен	Снижение	betaine-homocysteine S-methyltransferase activity [GO:0047150]; zinc ion binding [GO:0008270]; methionine biosynthetic process [GO:0009086]; methylation [GO:0032259]
G3PLN1	Белок, содержащий домен гистона	Повышение	nucleosome [GO:0000786]; nucleus [GO:0005634]; DNA binding [GO:0003677]; protein heterodimerization activity [GO:0046982]
G3P4E3	Парвальбумин типа бета	Снижение	calcium ion binding [GO:0005509]
G3Q5U8	Пероксиредоксин-1	Снижение	peroxidase activity [GO:0004601]; peroxiredoxin activity [GO:0051920]
G3NR48	Плазминоген	Повышение	extracellular region [GO:0005576]; serine-type endopeptidase activity [GO:0004252]; blood coagulation [GO:0007596]; fibrinolysis [GO:0042730]; tissue remodeling [GO:0048771]
G3NU83	Ретинол-связывающий белок 44	Повышение	retinoid binding [GO:0005501]; retinol transmembrane transporter activity [GO:0034632]
G3NMK8	Белок, содержащий домен серпина 1	Повышение	extracellular space [GO:0005615]

G3NZ99	Белок, содержащий домен серпина 2	Повышение	extracellular space [GO:0005615]
G3NJV2	Серпин	Повышение	extracellular space [GO:0005615]
G3QBF0	Супероксиддисмутаза	Снижение	metal ion binding [GO:0046872]; superoxide dismutase activity [GO:0004784]
G3P6I9	Триозофосфатизомераза	Снижение	triose-phosphate isomerase activity [GO:0004807]; gluconeogenesis [GO:0006094]; glycolytic process [GO:0006096]

Таблица 6 - Белки *S. solidus*, обнаруженные в смывах зараженных особей трехиглой колюшки *G. aculeatus* и в смывах с покровов тела инвазионных плероцеркоидов паразита.

ID белка (UniprotKB)	Название белка	Термины Gene Ontology [42]
A0A0X3NYX0	Аннексин А7	calcium ion binding [GO:0005509]; calcium-dependent phospholipid binding [GO:0005544]
A0A0X3NJG6	Серпин В13	extracellular space [GO:0005615]
A0A0X3Q4H0	Пептидил-пролил цис-транс изомераза	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity [GO:0003755]; protein folding [GO:0006457]
A0A183TNV9	Малатдегидрогеназа	L-malate dehydrogenase activity [GO:0030060]; carbohydrate metabolic process [GO:0005975]; malate metabolic process [GO:0006108]
A0A183SUD4	NADP-зависимый малик- фермент	malate dehydrogenase (decarboxylating) (NAD+) activity [GO:0004471]; metal ion binding [GO:0046872]; NAD binding [GO:0051287]
A0A0X3PU32	Белок, связывающий жирные кислоты, гомолог 1	lipid binding [GO:0008289]
A0A183T708	Белок, связывающий жирные кислоты b	lipid binding [GO:0008289]
A0A0X3PY34	Северин (Гельзолин)	actin filament binding [GO:0051015]
A0A0X3PNR9	Тирозиновая протеинфосфатаза С рецепторного типа Н	
A0A0X3NRV9	Лизин-тРНК лигаза	

A0A0X3NU90	Дегликаза DJ-1 (Protein/nucleic acid deglycase DJ-1)	
A0A183SRL7	Белок содержащий домен LAM_G_DOMAIN	
A0A0V0JBG8	Неохарактеризованный белок, содержащий домен фибронектина типа III	
A0A0X3NN70	Неохарактеризованный белок	
A0A0X3NPC9	Неохарактеризованный белок	
A0A0X3NYR5	Неохарактеризованный белок	
A0A0X3NZD8	Неохарактеризованный белок	
A0A0X3P289	Неохарактеризованный белок	
A0A0X3P9S4	Неохарактеризованный белок	
A0A0X3PB14	Неохарактеризованный белок	integral component of membrane [GO:0016021]
A0A0X3PGQ5	Неохарактеризованный белок	
A0A0X3PL29	Неохарактеризованный белок	
A0A0X3PLU8	Неохарактеризованный белок	
A0A0X3PM17	Неохарактеризованный белок	
A0A0X3PQT0	Неохарактеризованный белок	

A0A0X3PVR8	Неохарактеризованный белок
A0A0X3Q756	Неохарактеризованный белок
A0A183TM18	Неохарактеризованный белок
A0A0X3PYM0	Неохарактеризованный белок
A0A183TTH0	Неохарактеризованный белок (Taeniidae antigen like protein)
