

Ю.П. Джиоев¹, А.О. Ревизор², В.М. Яхненко³, И.В. Козлова^{1,2}, Е.К. Дорощенко¹, О.В. Лисак¹,
О.В. Сунцова¹, О.О. Черноиванова¹, А.И. Парамонов¹

ИЗОФЕРМЕНТНАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ КЛЕЩЕЙ *IXODES PERSULCATUS* SCHULZE (ACARI: IXODIDAE) В РЕКРЕАЦИОННЫХ ЗОНАХ г. ИРКУТСКА

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

² Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

³ Лимнологический институт СО РАН (Иркутск)

На двух выборках клещей из рекреационных зон пригородных районов г. Иркутск показана аллозимная структура популяции клещей *Ixodes persulcatus* по 8 ферментным системам. Из 13 локусов, которые кодируют эти ферменты, 8 оказались полиморфными. На основе аллозимного анализа популяции клещей выявлена большая их внутривидовая гетерогенность и отсутствие различий между двумя популяциями из разных очагов. Подобная картина свидетельствует о возможно большой скорости миграции генов между популяциями и о их близком родстве.

Ключевые слова: рекреационная зона, клещи, ферментные системы, полиморфизм

IZOENZYME STRUCTURE OF POPULATIONS OF TICKS *IXODES PERSULCATUS* SCHULZE (ACARI: IXODIDAE) IN RECREATION AREAS OF IRKUTSK CITY

Yu.P. Dzhioyev¹, A.O. Revizor², V.M. Yahrenko³, I.V. Kozlova^{1,2}, E.K. Doroshchenko¹,
O.V. Lisak¹, O.V. Suntsova¹, O.O. Chernovanova¹, A.I. Paramonov¹

¹ Scientific Center of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

² Irkutsk State Medical University, Irkutsk

³ Limnological Institute SB RAS, Irkutsk

Allozyme structure of the population of ticks *Ixodes persulcatus* in 8 enzyme systems is shown in two samples of ticks from the recreational areas in suburbs of Irkutsk. From the total of 13 loci, which encode these enzymes, eight were polymorphic. Based on allozyme analysis of populations of mites, it is found that most of them show intrapopulation heterogeneity and the lack of difference between the two populations from different foci. A similar pattern may indicate a large rate of migration of genes between populations and their close relatives.

Key words: recreation area, ticks, enzyme systems, polymorphism

Природная среда территории любого большого города и его рекреационных зон всегда являются объектом сильнейшего антропогенного пресса с неизбежным ее загрязнением. Любые сложные природные системы, в том числе и паразитарные, замыкающиеся на человека, не могут не реагировать на изменение среды, переходя на иной уровень функционирования. Не являются исключением природные очаги инфекций, передаваемых кровососущими клещами [1]. В пригородных районах г. Иркутска, в его рекреационных зонах существуют очаги смешанных клещевых инфекций, таких, как клещевой энцефалит, клещевые боррелиозы, риккетсиозы и эрлихиозы.

Степень специфичности отношений между кровососущими клещами и возбудителями болезней определяется рядом факторов, в том числе биохимическими особенностями клещей. Эта проблема приобретает особое значение при изучении взаимоотношений между членистоногими и возбудителями болезней [7, 8]. Действие патогенов на их хозяев-переносчиков — весьма важный компонент существования сложных паразитарных систем. Действие различных паразитов меняет исходные реакции беспозвоночного хозяина-переносчика на факторы внешней среды [7, 11]. Изучение генетического состава популяций клещей (по ферменту

малатдегидрогеназа) на протяжении их ареала выявило изменение соотношения гомозиготной и гетерозиготной их составляющей. Эти изменения оказалось возможным связать с разной встречаемостью морфологически измененных клещей и предположить наличие связи этого феномена с разной встречаемостью генетически различающихся доминирующих штаммов вируса клещевого энцефалита.

По результатам изоферментного анализа ADH, GPI, MDH установлено фенотипическое проявление генетической гетерогенности клещевой популяции, что проявляется в различии их локомоторной активности и устойчивости к высушиванию [9]. Однако никакой корреляции между физиологическим возрастом и генотипами клещей обнаружено не было. Были выявлены достоверные изменения частот генотипов α-GPDH в течение суток. Подобный факт имеет немаловажное значение, так как преимагинальные фазы клещей имеют возможность присасываться к прокормителям в разное время суток, а сами хозяева различаются по своей суточной активности. Как хорошо известно, хозяева клещей (в основном мелкие грызуны) являются основным резервуаром вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) [2–4]. Выявлена связь генотипов и интенсивности заражения боррелиями

[10], географическая изменчивость генотипов MDH и субтипов ВКЭ [5].

Не исключено, что изменение доминирования разных штаммов вируса (различающихся по тяжести вызываемых ими заболеваний) окажется связанным с антропогенным влиянием, меняющим физиологию переносчиков. Можно полагать, что изучение белкового состава клещей позволит ближе подойти к изучению проблемы взаимоотношений между переносчиками и возбудителями [9, 12].

В этой связи, мы полагаем, что ведущую роль приобретают исследования в области генотипирования клещей. Генотипирование таежных и лесных клещей по структуре ДНК находится на стадии накопления расшифрованных данных и не позволяет судить об основах разнообразия даже крупных популяционных блоков этих видов, в то время как изучение методом изоферментного анализа популяционной гетерогенности стало общепризнанным инструментом популяционной генетики и молекулярной биологии [5, 16, 20].

Целью данной работы являлась оценка изоферментного полиморфизма в популяциях клещей *I. persulcatus* из природных очагов пригородных рекреационных зон г. Иркутска

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Популяции клещей *I. persulcatus* были собраны в 2006 и 2008 годах в лесных массивах вдоль Байкальского и Голоустнинского трактов г. Иркутска. Всего исследовано 135 клещей, из них 127 собраны на Байкальском, 8 — на Голоустнинском трактах. Сбор производился на флаг в период со второй декады мая по первую декаду июня в первой половине дня. Для анализа были отобраны только взрослые особи как женского (88 клещей), так и мужского (47 клещей) пола. Клещи транспортировались до лаборатории в увлажненной марле, затем были заморожены в пластиковых пробирках в морозильной камере при температуре -18°C .

Все особи были гомогенизированы в чашках Петри в 0,05 М Трис-НСI буфере (pH 7,2) с добавлением 1 % Тритон X100, 40 % сахарозы и -меркаптоэтанола [21], центрифугировали 30 мин при 10000 об/мин для удаления нерастворимого материала. Электрофоретический анализ полученных супернатантов проведен в вертикальных блоках полиакриламидного геля по стандартным методам [14, 21]. Для разделения белков использовали две электродные буферные системы: трис-глициновую (А) и трис-ЭДТА-боратную (Б). Исследовано 8 ферментных систем (табл. 1). Для обозначения локусов использованы рекомендации Шаке и др. [23].

Выбор модели наследования для изолюкусной пары MDH-1,2, проведен с использованием метода максимального правдоподобия [24]. Анализ аллозимной изменчивости, тест на гомогенность аллельных частот между выборками осуществлялись с помощью программы BIOSYS-2 [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было исследовано 8 ферментных систем, кодируемых 13 локусами, из которых 8 были полиморфными (табл. 1). Фенотипическое проявление исследованных локусов соответствует ранее описанному для близкородственных видов гомологичным локусам с соответствующим генетическим контролем [5, 6, 10, 18, 20]. Локусы СК, LDH, EST-1, СА-2, СА-3 были мономорфными (табл. 1). Характер распределения фенотипов по изолюкусам MDH-1,2 позволил принять модель двух полиморфных локусов с равными частотами соответствующих аллелей. Распределение фенотипов по всем изолюкусам во всех исследованных выборках соответствовали соотношению Харди-Вайнберга. Выявлены высокий уровень изменчивости по всем полиморфным локусам, средняя гетерозиготность и уровень полиморфизма (табл. 1).

Анализ частот аллелей по локусу СА-1* с помощью теста на гомогенность не выявил достоверных различий между выборками Байкальского и Голоустнинского трактов. При совместных разгонках локусы фермента карбоангидразы у самок не обнаружены. По аллозимной изменчивости не выявлены наличия фиксированных альтернативных аллелей у исследованных клещей. Исследованные выборки были равновесны по всем локусам. Данные аллозимного анализа показали высокую гетерогенность выборок клещей, отобранных в одном месте, и отсутствие различий между выборками из разных географических точек.

Впервые к проблеме генетического полиморфизма клещевой популяции на примере *Ixodes ricinus* (L.) обратился J.A. Nealy [17, 18]. На основании анализа полиморфного локуса α -GPDH автор делает вывод о высокой гетерогенности изученных выборок клещей. Заключение о гетерогенности популяций *I. ricinus* по локусу MDH было сделано Р.М. Jensen [21]. Использование этого фермента в качестве маркера генетической гетерогенности известно у млекопитающих и у насекомых [13]. А.В. Семенов и др. [10] впервые по ферменту MDH проанализировали гетерогенность аллопатрической популяции клещей *Ixodes persulcatus* Schulze из окрестностей С-Петербурга. Было выявлено 3 различных локуса, различающихся по частоте встречаемости генотипов. Анализ 9 популяций *Amblyomma americanum* (L.) (семейство Ixodidae) юго-востока США по 14 ферментам показал отсутствие географической структурированности вида, что говорит о его генетической гомогенности. Отмечен низкий уровень гетерозиготности популяций этого вида (Hilburn [19]).

Поскольку в настоящей работе межпопуляционные сравнения проводились только по одному локусу, на небольшом количестве особей, то вывод об отсутствии обмена генами, и, следовательно, различий между изученными выборками — предварительный. Кроме того, для адекватной оценки белкового полиморфизма, уровня гетерогенности, генетической изменчивости выборок клещей не-

Таблица

Распределение фенотипов, частоты аллелей, проверка на гомогенность, средняя гетерозиготность в выборках *Ixodes persulcatus* Schulze

Выборка	Фенотип					n	Частоты аллелей		χ^2_1
АН									
	100/100	100/150	150/150			q100	q150		
БТ, 47 км, 2006. ♂	9	10	0	19		0, 77	0, 23	3, 04	
DP									
	100/100	100/80	80/80			q100	q80		
БТ, 47 км, 2006. ♀	7	3	0	10		0, 85	0,15	0, 27	
CA-1									
	100/100	100/105	105/105			q100	q105		
БТ, 47 км, 2006. ♂	10	10	0	20		0, 75	0, 25	2, 22	
ГТ, 33 км, 2008. ♂ $\chi^2_2 = 1, 344$	6	2	0	8		0, 88	0, 12	0, 22	
MDH-1, 2									
	100 ⁴	100 ³ /80	100 ² /80 ²	100/80 ³	80 ⁴		q100	q80	
БТ, 47 км, 2006. ♀	1	1	1	1	0	4	0, 63	0, 37	3, 98
SOD-1									
	100/100	100/150	150/150			q100	q150		
БТ, 47 км, 2006. ♀	12	18	0	30		0, 7	0, 3	5, 50	
SOD-2									
	100/100	100/150	150/150			q100	q150		
БТ, 47 км, 2006. ♀	13	17	0	30		0, 76	0, 24	6, 21*	
EST-1									
	100/100	100/150	150/150			q100	q150		
БТ, 47 км, 2006. ♀	7	7	0	14		0, 75	0, 25	1, 55	
F = 0, 6150 Hср. = 0, 2366									

Примечание: χ^2_1 – тест соответствия фактического и теоретически ожидаемого распределения генотипов по закону Харди-Вайнберга. χ^2_2 – тест на гомогенность. БТ – Байкальский тракт, ГТ – Голоустинский тракт. F – уровень полиморфных локусов. Hср. – средняя гетерозиготность. * – $p < 0,05$ – достоверность различий.

обходимо расширение анализируемого набора белков с привлечением большого числа неферментных локусов.

Исследования по изучению гетерогенности аллозимной структуры клещей из рекреационных зон г. Иркутска продолжают. Более достоверная картина паразитарной инфраструктуры в очагах интенсивного антропогенного воздействия возможна при наличии информации о взаимоотношениях компонентов экосистемы природных очагов инфекции при больших выборках из разных очагов и подборе аллозимных систем диагностики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А.Н., Дубинина Е.В., Семенов А.В. Смешанные инфекции в клещах-переносчиках рода *Ixodes* (Acarina: Ixodidae) правило, а не исключение // Клещевые и паразитарные болезни: матер. круглого стола в рамках Всеросс. науч. конф. «Клинические перспективы в инфектологии». 17–18 октября 2001 г., Санкт-Петербург. – Санкт-Петербург, 2001. – С. 9–16.

2. Алексеев А.Н. Обмен вирусом клещевого энцефалита между иксодовыми клещами, совместно питающимися на животном с подпороговым уровнем вирусемии // Мед. паразитол. – 1990. – № 2. – С. 48–50.

3. Алексеев А. Н. Обмен вирусом клещевого энцефалита между питающимися клещами при отсутствии вирусемии у позвоночного хозяина (дистантная передача) // Мед. паразитол. – 1991. – № 2. – С. 50–54.

4. Алексеев А.Н. Экспериментальные доказательства обмена вирусом клещевого энцефалита через слюну иксодид (транспитальный путь передачи). // IV Всес. совещ. по пробл. теоретич. и приклад. акарол.: тез. докл. – Ашхабад, 1990. – С. 8–9.

5. Гетерогенность популяций клещей иксодид – основа разнообразия генотипов вируса клещевого энцефалита Сибири и Дальнего Востока / А.Н. Алексеев [и др.] // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2007. – № 3. – С. 69–73.

6. Генетика изоферментов / Л.И. Корочкин [и др.]. – М.: Наука, 1977.

7. Частота аномалий экзоскелета у самок таежного клеща в популяциях из пригородов Иркутска и Братска / А.Я. Никитин [и др.] // Известия ИГУ. — 2011. — Т. 4, № 1. — С. 95—98.
8. Подборнов В.М. Возбудители болезней человека, животных и клещи. — М.: Наука, 2004.
9. Подборнов В.М., Смирнова И.П., Гришин В.П. Биохимическая характеристика организмов клещей семейств Argasidae и Ixodidae // Мед. паразитол. — 2007. — № 1. — С. 38—40.
10. А.В. Семенов Выявление генотипической неоднородности популяции *Ixodes persulcatus Schulze* (Acari: Ixodidae) Северо-запада России и особенности распределения клещевых патогенов возбудителей болезни Лайма и эрлихиозов в различных генотипах // Мед. паразит. — 2001. — № 3. — С. 11—15.
11. Alekseev A.N., Dubinina H.V. Abiotic parameters and diel and seasonal activity of *Borrelia*-infected and uninfected *Ixodes persulcatus* (Acarina, Ixodidae) // J. Med. Entomol. — 2000. — Vol. 37, N 1. — P. 9—15.
12. Alekseev A.N., Dubinina H.V., Chirov P.A. Tick morphology, tick microbiocenosis, and the ability to accumulate tick-borne pathogenesis as a result of anthropogenic pressure? // Inter. Jour. Med. Microbiol. — 2006. — Vol. 296. — S1. — P. 169—171.
13. Genetic variation in natural population of five *Drosophila* species and the hypothesis of the selective neutrality of protein polymorphisms / F.I. Ayala [et al.] // Genetics. — 1974. — Vol. 77. — P. 343—384.
14. Black W.C. BIOSYS-2. A computer program for the analysis of allelic variation in genetics // Dept. Microbiol. Colorado State Univ. Fort Collins Colorado, 1997.
15. Davis B.J. Disk-electrophoresis. 2. Method and application to the human serum proteins // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1964. — Vol. 121. — P. 404—427.
16. Harris H. The principles of human biochemical genetics // 2nd Ed. North Holland. — 1975. — P. 402.
17. Healy J.A. Analysis of α -glycerophosphate dehydrogenase variability in the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) // Genetic. — 1979. — Vol. 1. — P. 19—30.
18. Healy J.A. E., Cross T. F., Healy A. The α -GPDH polymorphism in the tick *Ixodes ricinus*: similar diurnal trends in genotypic composition in Irish and Swedish population samples // Experiment. and Appl. Acarology. — 2004. — Vol. 32. — P. 111—118.
19. Hilburn L.R., Sattler P.W. Electrophoretically detectable protein variation in natural populations of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) // Heredity. — 1986. — Vol. 56. — P. 67—74.
20. Hopkinson D.A. Recent work on isoenzymes in man // Ann. Rev. Genet. — 1971. — Vol. 5. — P. 5—16.
21. Jensen P.M., Kaufmann U., Smirnova L. Diurnal activity of *Ixodes ricinus* in Denmark: Aspects of physiological age and genotypic variation // Heredity. — 1999. — Vol. 130. — P. 325—330.
22. Peacock A.C., Bunting S.L., Queen K.G. Serum protein electrophoresis in acrylamide gel: patterns from normal human subjects // Science. — 1965. — Vol. 147. — P. 1451—1452.
23. Gene nomenclature for protein coding loci in fish / J.B. Shaklee [et al.] // Trans. Amer. Fish. Soc. — 1990. — Vol. 119. — P. 2—15.
24. Waples R.S. Estimation of Allele Frequencies at Isoloci // Genetics. — 1988. — Vol. 118. — P. 371—384.

Сведения об авторах

Джигоев Юрий Павлович — к.б.н., старший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; e-mail: alanir07@mail.ru)

Ревизор Александр Олегович — аспирант кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ИГМУ (г. Иркутск, ул. Красного восстания, 1)

Яхненко Вера Михайловна — к.б.н., научный сотрудник, Лимнологический институт СО РАН (г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3., Лимнологический институт СО РАН)

Козлова Ирина Валерьевна — д.м.н., зав. лаборатории молекулярной эпидемиологии и генодиагностики Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Дорощенко Елена Константиновна — младший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Лисак Оксана Васильевна — младший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Сунцова Ольга Владимировна — к.б.н., научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Черноиванова Ольга Олеговна — младший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3)

Парамонов Алексей Игоревич — младший научный сотрудник Института эпидемиологии и микробиологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 3; e-mail: Paramonov_a.i@mail.ru)