

## РЕГИСТРАЦИЯ ФЕНОЛОКСИДАЗОЗАВИСИМЫХ И -НЕЗАВИСИМЫХ МЕХАНИЗМОВ ОПСОНИЗАЦИИ ПАТОГЕНОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ХИТИНА, В ГЕМОЛИМФЕ НАСЕКОМЫХ

© 2011 Л.Р. Гайфуллина

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

Поступила 28.06.2011

Исследована агглютинирующая активность гемолимфы *Leptinotarsa decemlineata* Say. при действии высокомолекулярных производных хитина - хитозана и сукцината хитозана. Разработана экспериментальная модель, демонстрирующая особенности иммуностимулирующего действия хитозана и сукцината хитозана, выражающегося в индукции фенолоксидазозависимых и -зависимых факторов иммунораспознавания соответственно.

**Ключевые слова:** колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say.), агглютинины, фенолоксидаза, хитозан, сукцинат хитозана.

Изучение механизмов устойчивости насекомых является важным звеном в решении целого ряда фундаментальных и практических проблем современной энтомологии.

Знание механизмов защитных реакций насекомых необходимо для понимания закономерностей эволюции иммунитета, а также целенаправленного подхода к проблеме управления популяциями насекомых.

Агглютинины насекомых играют медиаторную роль в иммунитете насекомых, участвуя в процессах распознавания и опсонизации чужеродных объектов.

Согласно литературным данным, у насекомых процесс распознавания осуществляется с участием фенолоксидазной системы (ФОС) и сопровождается активацией иммунных клеток [13, 17]. В связи с чрезвычайной важностью процесса распознавания в формировании иммунного ответа насекомых механизмы данного взаимодействия представляют несомненный интерес для детальных исследований.

Реализация иммунных функций агглютинидами насекомых может осуществляться различными способами. Агглютинины могут агглютинировать микроорганизмы, которые затем легко фагоцитируются и инкапсулируются. Кроме того, опсонизация может осуществляться посредством активации ФОС [17]. Ингибированием фенолоксидаз фенилтиомочевинной показано, что одни агглютинины индуцируют фагоцитоз через активацию ФОС, а другие осуществляют фенолоксидазозависимый путь опсонизации. Также существует третий – промежуточный – путь опсонизации, в который вовлечены фенолоксидазозависимые и – независимые механизмы создания лектин-индуцированного уровня фагоцитоза. Возможно, механизм участия фенолоксидаз в опсонизации основан на перекрестном связывании тирозиновых интермедиатов с рецепторами на поверхности гемоцитов.

Цель настоящей работы заключалась в изучении фенолоксидазозависимых и независимых механизмов агглютинации микроорганизмов при действии на насекомых иммуностимуляторов – высокомолекулярных производных хитина.

Выбор в качестве иммуностимуляторов хитозана и сукцината хитозана неслучаен. Ранее было показано, что олигомеры хитина повышают выживаемость насекомых при действии неблагоприятных факторов, изменяют скорость онтогенетических процессов, а также в отсутствие патогена индуцируют ряд защитных гуморальных реакций, характерных для противомикробного ответа [8, 14]. Согласно результатам наших недавних исследований, иммуностимулирующими свойствами обладают и высокомолекулярные хитиновые производные – хитозан и сукцинат хитозана. Так, у медоносной пчелы хитозан повышает экспрессию генов антимикробных пептидов, стимулирует клеточные реакции гемолимфы, вызывает изменение активности дифенолоксидазы и антиокислительных ферментов, аналогичное неспецифическому ответу гуморальной системы насекомых на внедрение патогена [1, 6]. Мы предполагаем, что такое свойство хитиновых производных обусловлено их структурным сходством с липополисахаридами клеточных стенок микроорганизмов, исполняющими роль активаторов иммунитета.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В эксперименте оценивалась агглютинирующая и фенолоксидазная активность гемолимфы при действии хитозана и сукцината хитозана, а также при инъекции *Bacillus subtilis* и ингибировании фенолоксидазы фенилтиомочевинной (ФТМ) на фоне действия хитозана и сукцината хитозана. В качестве модельного объекта использовали личинки колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) 4 возраста.

В исследовании использовались личинки *L. decemlineata* 4 возраста. Хитозан (200кДа, 82% деацетилирования) и сукцинат хитозана (330кДа, 95% деацетилирования) добавляли в пищу в концентрации 0,01%. В качестве ингибитора фенолоксидазы использовали ФТМ в концентрации 0,01%, а в качестве чужеродного агента – *B. subtilis* (титр  $2 \times 10^8$  клеток/мкл). В качестве контроля для инъекции использовали физиологический раствор (рН 7,4). Агглютинирующую активность гемолимфы определяли путем двукратного серийного разведения гемолимфы в круглодонных микротитражных планшетах с использованием трипсини-

зированных глутаральдегидфиксированных эритроцитов человека [16]. Наличие и степень агглютинации учитывали визуально регистрацией самопроизвольно выпадающих хлопьев с оценкой от четырех плюсов (полная агглютинация) до минуса (отсутствие агглютинации). Наибольшее разведение гемолимфы, при котором еще происходила агглютинация эритроцитов, принималось за титр гемагглютининов. Для определения углеводной специфичности гемагглютининов использовали D(-)галактозу, D(-)фруктозу, D(+)-рамнозу, D(-)маннозу, L(+)-арабинозу, N-ацетил-D-галактозамин (NaGal), N-ацетил-D-глюкозамин (NaGlu), D(+)-лактозу, D(+)-мальтозу, сахарозу, хито-олигосахариды (ХОС, степень полимеризации 5-20, деацетилирования 70%), муцин и сукцинат хитозана. Минимальную концентрацию, угнетающую реакцию агглютинации, определяли в серии последовательных двукратных разведений углевода, инкубируемых с раствором агглютининов постоянной концентрации. Исходная концентрация углеводов составляла для моно- и дисахаридов 1М, а для полисахаридов 1%. По истечении времени инкубации визуально регистрировали наличие и отсутствие агглютинации эритроцитов. Наименьшая концентрация углевода, при которой еще отсутствовала агглютинация, принималась за минимальную ингибирующую концентрацию углевода. Активность дифенолоксидазы (о-дифенол: O<sub>2</sub> оксидоредуктаза НФ 1.10.3.1) (ДФО) определяли в трисНСl экстрагирующем буфере рН 7,5 по отношению к субстрату L-дигидроксифенилаланину на спектрофотометре Shimadzu при 470 нм, 37°С, по изменению оптической плотности за 5 мин в пересчете на концентрацию белка [5]. Концентрацию белка определяли по

Бредфорд [7], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием среднеарифметического значения и ошибки средней. Достоверность различия значений определяли по t-критерию Стьюдента [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате суточного воздействия хитиновых соединений увеличился титр агглютининов в гемолимфе *L. decemlineata* в 2 раза в случае с хитозаном и в 4 раза в случае с сукцинатом хитозана, а также повысилась активность ДФО (табл. 1). В норме агглютинация ингибировалась муцином, гепарином, ГУК и ХОС, что соответствует ранее полученным данным [9, 16]. Минимальная ингибирующая концентрация ХОС снизилась вдвое при действии хитозана и сукцината хитозана, что свидетельствует об увеличении количества агглютининов в гемолимфе имаго колорадского жука, имеющих родство к ХОС. Кроме того, после действия на личинок данных хитополисахаридов агглютинация начала ингибироваться также сукцинатом хитозана. Сукцинат хитозана также индуцировал в гемолимфе *L. decemlineata* агглютинины, способные связываться с NaGlu и NaGal, т.е. увеличился спектр гемагглютининов с различной углеводной специфичностью. Таким образом, высокомолекулярные производные хитина – хитозан и сукцинат хитозана – индуцируют в гемолимфе личинок *L. decemlineata* синтез дополнительных агглютининов или (и) вызывают активацию неактивных форм гликопротеидов.

**Таблица 1.** Титр агглютининов в гемолимфе *L. decemlineata* при действии хитозана и сукцината хитозана

Вариант	Титр агглютининов									Активность ДФО, ед. акт./мин/мг белка
	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	
контроль	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-	-	0,842±0,034
хитозан	4+	4+	4+	3+	3+	2+	+	-	-	1,012±0,009
Сукцинат хитозана	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	+	-	1,041±0,0014

**Таблица 2.** Ингибирование агглютинации углеводами

Углевод	Минимальная ингибирующая концентрация углевода		
	контроль	хитозан	сукцинат хитозана
NaGal	-	-	0,5М
NaGlu	-	-	0,25М
ХОС	0,125%	0,0625%	0,0625%
ГУК	0,250%	0,250%	0,250%
гепарин	0,125%	0,125%	0,125%
муцин	0,0625%	0,0625%	0,0625%
сукцинат хитозана	-	0,5%	0,5%

Итак, высокомолекулярные производные хитина – хитозан и сукцинат хитозана – индуцируют в гемолимфе личинок *L. decemlineata* синтез дополнительных агглютининов, как и в случае с развитием кишечной инфекции при действии БТБ [9]. Хитозан и сукцинат хитозана в неизменном виде, а также продукты их деградации могут всасываться в кишечнике насекомых, попадать в гемолимфу и индуцировать агглютинирующую активность, как повышением синтеза агглютининов, так и активацией неактивных

форм гликопротеидов. Агглютинины могут синтезироваться гемоцитами после прямого контакта с антигеном [2], а также клетками жирового тела при регуляции гемоцитарными медиаторами и гормонами [10]. Таким образом, хитозан и сукцинат хитозана могут индуцировать как гемоцитарные агглютинины, выполняющие рецепторные функции, так и плазменные опсоныны.

Примечательно, что хитозан и сукцинат хитозана индуцируют более широкий ряд специфичных агглю-

тининов, нежели *Bacillus thuringiensis*, который индуцирует агглютинины, специфичные лишь к ХОС и гепарину [9]. Вместе с тем, сукцинат хитозана обнаруживает более выраженное иммуностимулирующее действие, чем хитозан, индуцируя большее количество агглютининов с более широким спектром углеводной специфичности. Вероятно, такое различие связано с различной растворимостью данных соединений. Высокомолекулярный хитозан не растворим в воде, тогда как сукцинат хитозана благодаря сукцинатаниону растворим в воде и более активен. Кроме того, янтарная кислота (сукцинат) является не только энергетическим субстратом, но и регулятором функций живых систем [3], что обуславливает возможность применения сукцинатсодержащих веществ для повы-

шения неспецифической устойчивости организма к экстремальным воздействиям.

Параллельное увеличение агглютинирующей и фенолоксидазной активности гемолимфы колорадского жука при действии хитиновых производных дает основание предполагать наличие связи в функционировании данных факторов иммунитета. Более достоверное наличие данной связи демонстрируется при ингибировании фенолоксидаз в гемолимфе колорадского жука.

В норме инъекция ФТМ в гемоцель насекомого снизила активность ДФО в 14 раз (табл. 3) и титр агглютининов вдвое (табл. 4), что указывает на наличие фенолоксидазозависимого механизма агглютинации эритроцитов.

**Таблица 3.** Активность ДФО в гемолимфе *L. decemlineata* при инъекции ФТМ и *B. subtilis* на фоне действия хитозана и сукцината хитозана

Вариант	Активность ДФО, ед. акт./мин/мг белка		
	Контроль	Хитозан	Сукцинат хитозана
Инъекция ФТМ	0,060±0,004	0,094±0,009	0,036±0,004
Инъекция <i>B. subtilis</i>	0,106±0,003	0,049±0,002	0,059±0,009
Инъекция ФТМ+ <i>B. subtilis</i>	0,048±0,006	0,134±0,012	0,033±0,002

**Таблица 4.** Титр агглютининов в гемолимфе *L. decemlineata* при инъекции ФТМ и *B. subtilis* на фоне действия хитозана и сукцината хитозана

Вариант	Титр агглютининов									
	128	256	512	1024	2048	4096	8192	16384	32768	
контроль										
Без инъекции	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-	-	
Инъекция физ. раствора	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-	-	
Инъекция ФТМ	3+	3+	2+	+	+	-	-	-	-	
Инъекция <i>B. subtilis</i>	3+	2+	+	+	-	-	-	-	-	
Инъекция ФТМ+ <i>B. subtilis</i>	3+	2+	2+	+	+	-	-	-	-	
хитозан										
Без инъекции	4+	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-	
Инъекция физ. раствора	4+	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-	
Инъекция ФТМ	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-	-	
Инъекция <i>B. subtilis</i>	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-	-	
Инъекция ФТМ+ <i>B. subtilis</i>	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-	-	
сукцинат хитозана										
Без инъекции	4+	4+	3+	3+	2+	2+	+	+	-	
Инъекция физ. раствора	4+	4+	3+	3+	2+	2+	+	+	-	
Инъекция ФТМ	4+	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-	
Инъекция <i>B. subtilis</i>	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-	-	
Инъекция ФТМ+ <i>B. subtilis</i>	4+	3+	3+	2+	2+	+	+	-	-	

Инъекция суспензии *B. subtilis* вызвала 8-кратное снижение активности ДФО и 4-кратное снижение титра агглютининов, что может быть следствием связывания части агглютининов с микроорганизмом и участием в данном процессе ФОС, приводящим к исчерпанию активного фермента. С другой стороны, активация профенолоксидазы у насекомых может осуществляться самими эндогенными агглютинами [18], и таким образом уменьшение количества свободных агглютининов в гемолимфе может приводить к снижению интенсивности процесса активации фермента.

При одновременной инъекции суспензии *B. subtilis* и ФТМ также регистрировалось многократное снижение активности ДФО, тогда как титр агглютининов снизился относительно контроля лишь вдвое, как в варианте с инъекцией только ФТМ. Данное наблюдение

указывает на отсутствие связывания части агглютининов с микроорганизмом и, следовательно, на фенолоксидазозависимый механизм агглютинации *B. subtilis*.

На фоне действия сукцината хитозана наблюдались аналогичные изменения титра агглютининов при инъекции ФТМ и суспензии *B. subtilis*, отличающиеся от контрольного варианта более высоким уровнем агглютинирующей активности гемолимфы.

На фоне действия хитозана не наблюдалось фенолоксидазозависимого характера агглютинации *B. subtilis*, что указывает на несколько различный спектр агглютининов, индуцируемых данными производными хитина.

Ранее было показано, что фагоцитоз бактерий гемоцитами *Ceratitis capitata* зависит от проФО активирующей системы, а именно от RGD-связывающих

рецепторов, (ФАК)/sarcoma и митоген-активированного протеин киназного сигнальных путей, которые индуцируют секрецию ФО активирующих пептидов [12], а также от активности дора декарбоксилазы - мультифункционального фермента, участвующего, в частности, в защитных реакциях насекомых [15]. Примечательно, что проФО зависимым является фагоцитоз бактерий, тогда как фагоцитоз латексных шариков и липополисахаридов является проФО независимым [11, 12, 15]. Результаты данных исследований подтверждают наше предположение о схожести механизмов стимулирования иммунитета насекомых липополисахаридами и хитиновыми производными.

Согласно вышеизложенным данным, высокомолекулярные хитиновые производные – хитозан и сукцинат хитозана – с различной интенсивностью индуцируют в организме *L. decemlineata* факторы иммунораспознавания. Сукцинат хитозана обнаруживает более выраженное иммуностимулирующее действие в отношении *L. decemlineata*, индуцируя и (или) активируя большее количество агглютининов с более широким спектром углеводной специфичности. Агглютинация эритроцитов гемолимфой колорадского жука осуществляется фенолоксидазозависимыми и -независимыми механизмами. Опсонизация *B. subtilis* носит фенолоксидазозависимый характер. Сукцинат хитозана индуцирует фенолоксидазозависимые механизмы опсонизации патогенов, тогда как хитозан – фенолоксидазонезависимые. Процесс распознавания осуществляется скоординированными синергичными реакциями фенолоксидазной системы и агглютининов насекомых: активируясь эндогенными агглютинидами, фенолоксидазная система, в свою очередь, опосредует опсонизацию чужеродных агентов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гайфуллина Л.Р., Салтыкова Е.С., Николенко А.Г. Действие хитозана на активность клеточной и гуморальной защитной системы медоносной пчелы // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: Материалы X междунар. конф. Н. Новгород: Изд. ННГУ, 2010. С. 291-295.
2. Глулов В.В. Механизмы резистентности насекомых / В.В. Глулов. Патогены насекомых: Структурные и функциональные аспекты. М., 2001. С. 475-557.
3. Кондрашова М.Н. Гормоноподобное действие янтарной кислоты // Вопросы биол., мед. и фарм. химии. 2002. № 1. С. 7-12.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., 1990.
5. Раушенбах И.Ю. Стресс-реакция насекомых: механизм, генетический контроль, роль в адаптации // Генетика. 1997. Т. 33. № 8. С. 1110–1118.
6. Салтыкова Е.С., Гайфуллина Л.Р., Ильясов Р.А., Николенко А.Г. Действие хитозана на индукцию основных антибактериальных пептидов у медоносной пчелы // Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Материалы X междунар. конф. Н.Новгород: Изд. ННГУ, 2010. С. 308-310.
7. Скоупс Р. Методы очистки белков. М: Мир, 1985. 358 с.
8. Furucawa S., Taniani K., Yang J. Induction of gene expression of antibacterial proteins by chitinoligomers in the silkworm, *Bombix mori* // Insect Mol. Biol. 1999. V. 8. № 1. P. 145-148.
9. Gaifullina L.R., Saltykova E.S., Ben'kovskaya G.V., Nikolenko A.G. Humoral immune reactions participation in resistance formation of Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) larvae and imago to a Biopreparation for potato // Resist. Pest Manag. Newsletter. 2005. V. 15. № 1. P. 9-12.
10. Kobayashi A. Insect defense molecules and reactive oxygen // Dev. Comp. Immunol. 1998. V. 22. P. 129.
11. Lamprou I., Mamali I., Dallas K. et al. Distinct signalling pathways promote phagocytosis of bacteria, latex beads and LPS in medfly haemocytes // Immunology. 2007. V. 121. P. 314-327.
12. Mavrouli M.D., Tsakas S., Theodorou G.L. et al. MAP kinases mediate phagocytosis and melanization via prophenoloxidase activation in medfly hemocytes // Biochem. Biophys. Acta. 2005. V. 1744. P. 145-156.
13. Nappi A.J., Christensen B.M. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity // Insect Biochem. Mol. Biol. 2005. V. 35. № 5. P. 443-459.
14. Saltykova E.S., Ben'kovskaya G.B., Poskryakov A.V. et al. Expression of phenoloxidase system in use of chitooligosaccharides as immunomodulators in insects // J. Evol. Biochem. Physiol. 2003. V. 39. № 4. P. 433-438.
15. Sideri M., Tsakas S., Markoutsas E. et al. Innate immunity in insects: surface-associated dopa decarboxylase-dependent pathways regulate phagocytosis, nodulation and melanization in medfly haemocytes // Immunology. 2007. V. 123. P. 528-537.
16. Stynen D., Peferoen M., De Loof A. Proteins with haemagglutinin activity in larvae of the Colorado beetle *Leptinotarsa decemlineata* // J. Insect Physiol. 1982. V. 28. № 5. P. 465-470.
17. Wilson R., Chen C., Racliffe N.A. Innate immunity in insects: the role of multiple, endogenous serum lectins in the recognition of foreign invaders in the cockroach *Blaberus discoidalis* // J. Immunol. 1999. V. 162. P. 1590-1596.
18. Yu X.-Q., Kanost M.R. *Manduca sexta* lipopolysaccharide-specific immunectin-2 protects larvae from bacteria infection // Dev. Comp. Immunol. 2003. V. 27. № 3. P. 189-196.

## REGISTRATION OF PHENOLOXIDASE DEPENDENT AND INDEPENDENT OPSONIZATION MECHANISMS OF PATHOGENS INDUCED BY HIGH MOLECULAR CHITIN DERIVATIVES IN THE HEMOLYMPH OF INSECTS

© 2011 L.R. Gaifullina

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Centre of RAS, Ufa

An agglutinating activity of *Leptinotarsa decemlineata* Say hemolymph under the influence of high molecular derivatives of chitin – chitosan and chitosan succinate has been investigated. An experimental model demonstrating features of the immunostimulatory effects of chitosan and chitosan succinate, which is expressed in the induction of the phenoloxidase independent and dependent factors of immunorecognition respectively, has been developed.

**Key words:** Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say.), agglutinins, phenoloxidase, chitosan, chitosan succinate.