

2.3. Механизмы цитотоксичности

- [2.1. Методические подходы при изучении кислородсодержащих радикалов](#)
- [2.2. Продукция кислородсодержащих радикалов в организме насекомых](#)

Механизмы, с помощью которых происходит уничтожение чужеродных клеток, а также собственных клеток организма насекомых, можно разделить на два типа. Первый связан с образованием высокореакционных кислородных метаболитов, которые способны вызывать гибель клеток. Подобные соединения могут образовываться в результате ряда ферментативных реакций как в различных клетках, в том числе и в гемоцитах, так и непосредственно в лимфе насекомых. Второй – это синтез различных ферментов, которые могут непосредственно вызывать структурные изменения в проникшем паразите. Например, лизоцим (мурамидаза) может гидролизовать гликозидную связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетил-мурамовой кислотой, входящих в состав бактериальных клеток [156]. Сюда же можно отнести вещества, которые не обладают ферментативной активностью, но способны взаимодействовать с мембраной или с поверхностными структурами чужеродной клетки и изменять их свойства. В первую очередь, это антибактериальные и цитолитические белки. Вопросы, связанные с синтезом и механизмом действия этих белков представлены в главе “Гуморальная система”, поэтому в данной части мы остановимся в основном на первом типе цитотоксических механизмов. Следует сразу оговориться, что подобное разделение механизмов по типам условное.

[2.1. Методические подходы при изучении кислородсодержащих радикалов](#)

Свободнорадикальные окислительные процессы являются одними из наиболее распространенных процессов, протекающих в живых организмах [33, 177, 216, 230, 288 и т.д.]. Короткоживущие кислородсодержащие радикалы (КР) (супероксидный, пероксинитрит, оксид азота, время жизни менее секунды) играют ключевые роли в многочисленных химических и биохимических реакциях. Имеющиеся методы основаны на прямой регистрации супероксидного радикала: гистохимическим методом - по выявлению восстановленных продуктов ловушек, подобных нитросинему [тетразолиевому*](#), [хемилюминесцентные методы**](#) и с использованием метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), который возможен лишь при температуре жидкого азота, что не приемлемо для большинства исследований. Кроме того, спектрофотометрические определения

невозможны в дисперсных и непрозрачных средах. Гистохимические методы также имеют ряд недостатков, связанных с низкой специфичностью и недостаточной чувствительностью используемых ловушек. Хемилюминесцентные методы с использованием люминола оказались неприемлемыми при изучении гемоцитов насекомых (Рис. 9) [200].

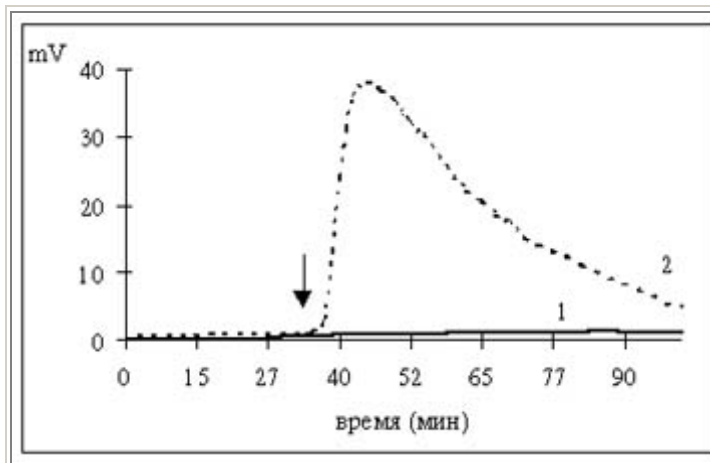
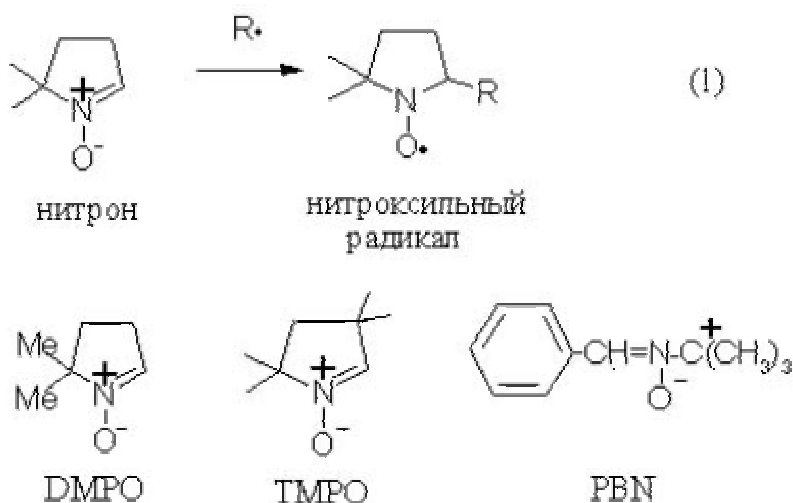


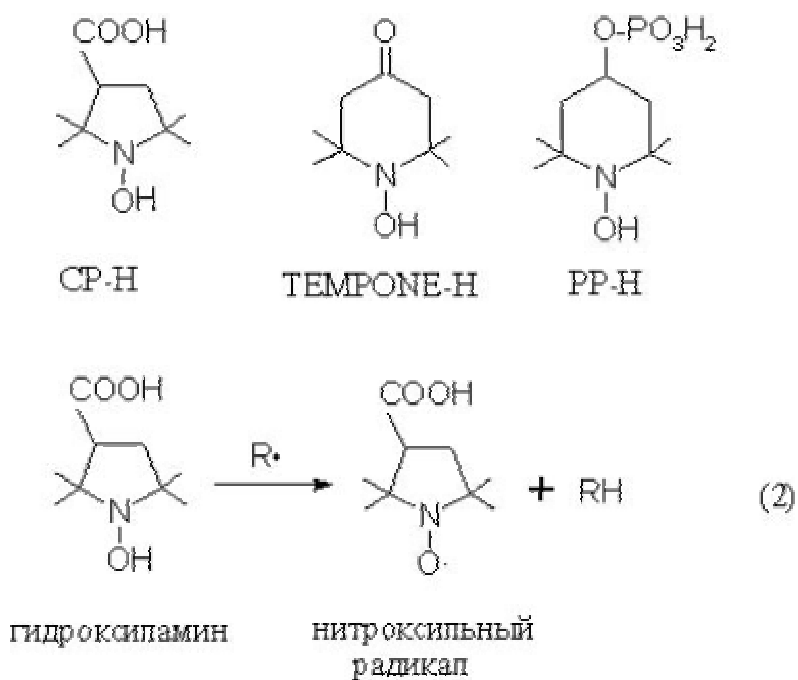
Рис.9. Кинетические кривые хемилюминесценции гемоцитов личинок большой вошиной моли *G.mellonella* (1) и нейтрофилов человека (2), стимулированных ЛПС (зимозаном или [ФМА*](#)) (показано стрелкой).**

Вероятно за счет присутствия в этих клетках разнообразных факторов светового гашения, например - фенольных соединений [16]. Следует также отметить, что о продуцировании КР можно судить по активности ряда антиоксидантных ферментов, в частности по регистрации супероксиддисмутазы (СОД), пероксидазы, каталазы и др. [51, 60].

В настоящее время одним из наиболее перспективных методов исследования свободнорадикальных процессов является метод спиновых ловушек. Этот метод особенно широко применяется в биохимических системах, где концентрация короткоживущих радикалов мала для их прямого детектирования. Метод спиновых ловушек основан на взаимодействии спиновой ловушки (обычно нитрон) с радикалами, при этом накапливается относительно устойчивый аддукт - нитроксильный радикал, который можно регистрировать ЭПР спектроскопией (1).



Если используемая концентрация спиновой ловушки достаточно высока (50-100 мМ), и константа скорости реакции (1) большая, то можно количественно определить концентрацию. Кроме того, по виду ЭПР спектра, полученного аддукта можно идентифицировать вид свободного радикала. Однако, при использовании стандартных спиновых ловушек (5,5-диметил-1-пирролин *N*- оксид, DMPO; 5-(диэтоксифосфорил)-5-метил-1-пирролин *N*-оксид, DEPMPO; 3,3,5,5-тетраметил-1-пирролин *N*- оксид, TMPO; *N*- трет-фенил-бутил нитрон, PBN и др.) в биологических образцах существует большая вероятность быстрого восстановления аддукта спиновой ловушки с радикалом, что затрудняет их регистрацию методом ЭПР. В настоящее время разработан ряд новых перспективных спиновых ловушек на основе пространственно затрудненных производных гидроксиламина, например 1-гидрокси-3-карбокси-пирролидин (CP-H [104]), 1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметил-4-оксо-пиперидин (TEMPON-H, [103]), 1-гидрокси-4-фосфоноокси-2,2,6,6-тетраметил-пиперидин (PP-H, [105]). Преимущество использования данных соединений заключается в повышении чувствительности определения короткоживущих радикалов более, чем в 10 раз по сравнению со стандартными спиновыми ловушками. Это происходит за счет того, что время жизни аддуктов этих ловушек (нитроксильные радикалы, см. реакцию (2)) значительно больше. Эти соединения могут быть использованы для определения абсолютного количества короткоживущих окислительных частиц таких, как супероксидный радикал, двуокись азота, пероксинитрит в химических и биологических системах. Для определения вида частицы требуются несложные дополнительные тесты с применением супероксиддисмутазы, каталазы, диметилсульфоксида и т.д. в качестве конкурентных к ловушкам веществ.



2.2. Продукция кислородсодержащих радикалов в организме насекомых

Известно, что у позвоночных животных во время фагоцитоза регистрируется взрыв метаболической активности нейтрофилов [16, 32]. Стремительно возрастает потребление кислорода, продуцирование перекисных анионов и других кислородсодержащих метаболитов. До настоящего времени у насекомых не было зарегистрировано подобных процессов в гемоцитах. В частности, Р.Андерсон с сотр. [54] показали, что в гемоцитах тараканов *Blaberus craniifer* не происходит восстановление нитросинего тетразолия и миелопероксидаза также отсутствует в этих клетках. Пероксидазную активность также не выявили в гемоцитах *G.mellonella* [92]. Авторы предположили, что механизмы разрушения бактерий в гемоцитах насекомых значительно отличаются от таковых у позвоночных. Впоследствии высокую активность СОД выявили в гемоцитах совок *Trichoplusia ni* [51]. Данный фермент предотвращает разрушение клеток насекомого от супероксид анионов. Образование СОД обнаружили в гемолимфе шести видов *Lepidoptera* [58, 59, 60]. Кроме того, значительную роль в классе насекомых играет профенолоксидазная система, представленная целым каскадом ферментативных реакций, одним из конечных продуктов которых является меланин [216]. Во время меланогенеза могут образовываться свободные радикалы кислорода, которые участвуют в цитотоксических реакциях при гранулообразовании и инкапсуляции чужеродного агента в гемоцеле насекомого [215, 216]. В первую очередь, необходимо отметить образование семихинонов во время окисления гидрохинонов (см. главу “Гуморальная система”). Подобные соединения способны взаимодействовать с кислородом, при этом образуется супероксид анион (O₂^{-*}) и в последующем гидроксильный радикал (*ОН) [216]. Кроме

того, в результате меланогенеза образуются такие высокореакционные соединения как индолхиноны, тригидроксифенолы и пр.[215]. Дигидрооксифенилаланин (ДОФА), который образуется после гидроксирования тирозина во время первого этапа меланогенеза, способен взаимодействовать с белками.

Не исключено, что существенную роль в образовании высокореакционных КР у насекомых играют дегидрогеназы [101]. Данные ферменты могут участвовать в многочисленных реакциях, в течение которых могут образовываться КР.

Нами было выявлено, что нитросиний тетразолий восстанавливается в гемоцитах насекомых, как правило, только в плазматоцитах и гранулоцитах. Преципитат формазана можно наблюдать, в основном, в плазматоцитах в виде диффузно распределенных в цитоплазме мелких гранул, в гранулоцитах - в виде крупных гранул (Рис. 6). НСТ-положительные гемоциты регистрировали во всех исследуемых нами насекомых, кроме крапивницы *A.urticae*, у которых не были выявлены гемоциты с подобной активностью ни в нативных личинках, ни в инъецированных бактериальной суспензией. НСТ-положительные гемоциты были зарегистрированы в гемолимфе нативных личинок последних возрастов следующих видов: *M.brassicae* - $2,9 \pm 0,3\%$; *G.mellonella* - $4,2 \pm 0,6\%$; *L.dispar* - $1,9 \pm 0,4\%$ (Lepidoptera); *L.decemlineata* - $5,8 \pm 0,6\%$ (Coleoptera); *Aeschna* - $5,5 \pm 1,5\%$ (Odonata); у имаго *Gryllus bimaculatus* - $25,5 \pm 1,63\%$ (Orthoptera). У личинок *G.mellonella* в условиях *in vitro* азид натрия или фенилтиомочевина (ФТМ) ингибируют образование КР в гемоцитах до 50%. Полное ингибирование генерации КР было зарегистрировано при совместном использовании ингибиторов (NaN₃+ФТМ). Подобный эффект можно выявить только в случае, когда ингибиторы были добавлены в среду при взятии гемолимфы (Рис.10). Если ингибиторы вносили в среду во время инкубирования монослоя гемоцитов с НСТ, то изменений в количестве НСТ-положительных клеток не регистрировали. При инкубировании монослоя гемоцитов с зимозаном или бактериальным липополисахаридом (ЛПС) количество НСТ-положительных гемоцитов в течение 3-4 часов резко возрастало в 2-3 раза (Рис. 11). В среде без активаторов через 3 часа инкубирования монослоя в фосфатном буфере отсутствовали НСТ-положительные клетки, но их количество резко возрастало после инкубирования с ЛПС или зимозаном. Добавление в инкубационную среду азид натрия или ФТМ приводило к снижению количества НСТ-положительных гемоцитов до 0,6 - 0,9% в обоих случаях (Рис. 12). При исследовании продукции КР *in vitro* у сверчка установили, что ЛПС и зимозан не активировали продукцию КР при инкубации в течение трех часов. Эффект подавления продукции КР при инкубации клеток без активаторов, также отсутствовал, при этом было зарегистрировано полное ингибирование образования формазана в гемоцитах в присутствии ФТМ или

NaN₃ вне зависимости от времени внесения ингибиторов (во время сбора гемолимфы или инкубации монослоя гемоцитов).

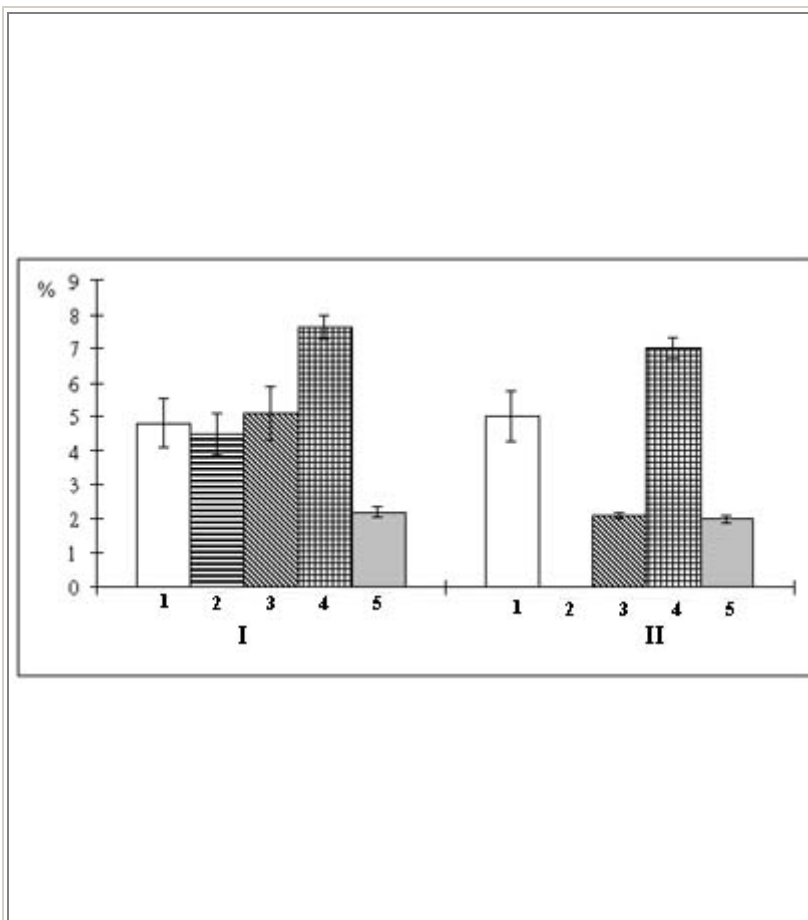


Рис.10. Количество НСТ- положительных гемоцитов *G.mellonella* в монослоях.

Варианты экспериментов: I - ингибиторы и активаторы добавляли в буфер для инкубирования; II - ингибиторы и активаторы добавляли в буфер для взятия образцов;
 1 - фосфатный буфер (контроль);
 2 - ЛПС или зимозан; 3- азид натрия;
 4 - фенилтиомочевина (ФТМ);
 5 - совместно 3 и 4.

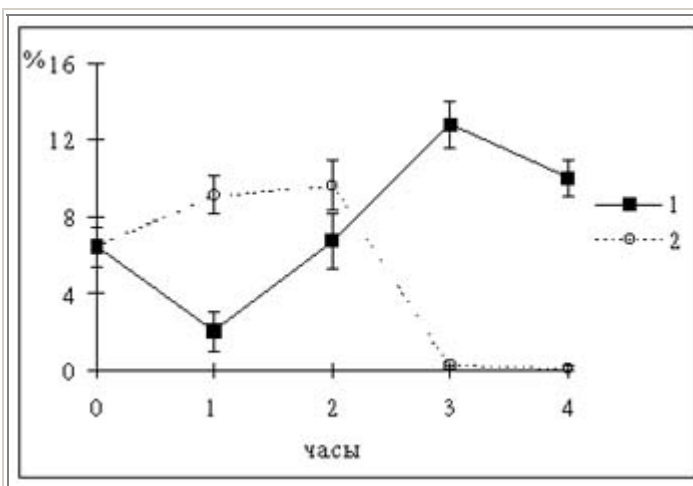


Рис.11. Изменение количества НСТ- положительных гемоцитов *G.mellonella* в монослое при инкубировании с ЛПС.

1 - инкубирование с ЛПС и 2- без него.

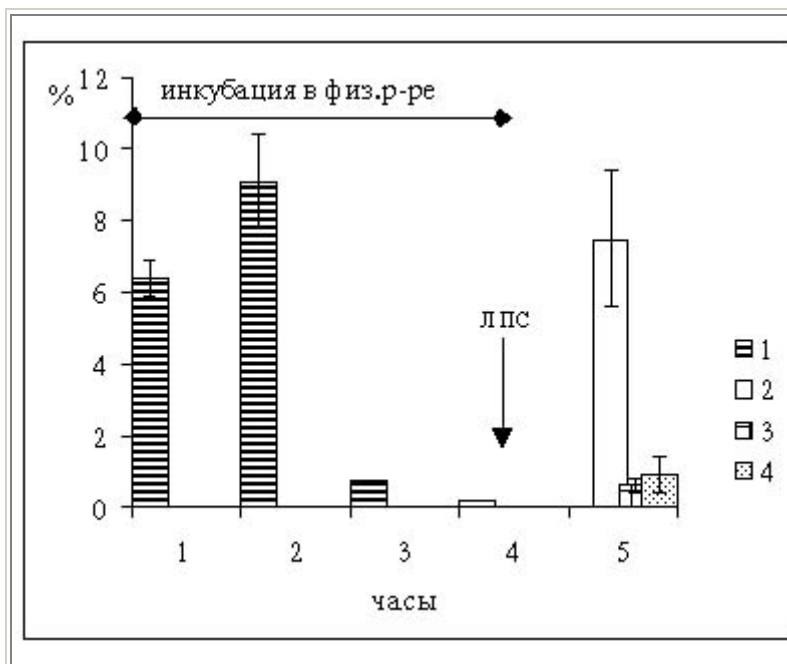


Рис.12. Изменение количества НСТ-положительных гемоцитов *G.mellonella* в монослое. После преинкубирования, когда не регистрируются положительные гемоциты в инкубационную среду добавляли ЛПС (2), с NaN_3 (3), с ФТМ (4) и без активаторов и ингибиторов - в фосфатном буфере(1).

Таким образом, можно предположить, что при взятии гемолимфы, т.е. при ранении, в гемоцитах происходит активация ферментных систем, в результате функционирования которых образуются КР. Существенным моментом в данных экспериментах является способность к активации гемоцитов под действием ЛПС или зимозана после преинкубации в буфере, когда ферментативная активность в гемоцитах практически полностью “затухает”. Можно провести определенную аналогию с “респираторным взрывом” нейтрофилов позвоночных, но это можно зарегистрировать только после преинкубации гемоцитов в буфере. Кроме того, уровень ответа гемоцитов на различные активаторы (ЛПС, зимозан) значительно ниже, чем в клетках позвоночных. В любом случае можно утверждать, что гемоциты активируются во время повреждения внешних покровов и могут вступать в различные клеточные реакции (дегрануляция, клампообразование и гранулообразование) уже находясь на определенном уровне активности. Активность систем, участвующих в образовании КР в гемоцитах сверчков не меняется в течении длительного времени. Основным сходством характерным как для гемоцитов сверчков, так и для гемоцитов большой вощиной моли является то, что в образовании КР в гемоцитах участвуют несколько ферментов или ферментных систем, такие как профенолоксидазная, респираторный каскад, возможно дегидрогеназы [101] и др.

Пероксидазную активность регистрировали в гемоцитах нативных личинок: *G. mellonella* - $73 \pm 9\%$; *M.brassicae* - $14,8 \pm 1,9\%$; *Aglais urticae* - $20,8 \pm 3,2\%$; *Leptinotarsa decemlineata* - $7 \pm 0,9\%$; *G.bimaculatus* - $19,7 \pm 1,6\%$ и у стрекоз рода *Aeschna* (*Ae. grandis*, *Ae.juncia*, *Ae.viridis*) - $14 \pm 3\%$. Выявление различного количества пероксидазоположительных клеток при использовании метода с диаминобензидином (ДАБ) - H_2O_2 и ДАБ без добавления H_2O_2 , позволяет предположить, что в гемоцитах существует

эндогенная система пероксидаза - H₂ O₂ . Подобная система была ранее выявлена в нейтрофилах человека [38, 39]. Тем не менее, для подтверждения существования подобной системы необходимо более строгие цитохимические доказательства.

В экспериментах с применением метода ЭПР мы использовали широко распространенные спиновые ловушки (DMPO, DEMPO и PBN) и не обнаружили O₂-* и OH-* радикалов в гемолимфе[#] гусениц большой вощиной моли *G. mellonella* и сибирского шелкопряда *Denrolimus sibiricus* [258]. Также не зарегистрировали сигнала соответствующих аддуктов (DEMPPO-OH, DMPO-OH и PBN-OH) при добавлении в гемолимфу и суспензию гемоцитов ЛПС, зимозан и ФМА (как активаторы фагоцитоза) и дигидрооксифенилаланина (ДОФА) (как субстрат для фенолоксидазы). При использовании спиновой ловушки CP-N, которая более чувствительна (примерно в 10 раз), чем нитроновые ловушки, была зарегистрирована генерация КР в гемолимфе и лимфе гусениц большой вощиной моли и сибирского шелкопряда (табл. 1,2).

Таблица 1

Образование КР в гемолимфе (Г) сибирского шелкопряда *D.sibiricus*, измеренное по скорости окисления спиновой ловушки CP-N в нитроксильный радикал CP

Г	Г + ФТМ	Г + ДОФА	Г + Д
12,4 ± 4,8	2,1 ± 1,0	56,6 ± 12,2 *	66,

n = 14; *P* < 0,01

Таблица 2

Образование КР в гемолимфе (Г) большой вощиной моли *G.mellonella*, измеренное по скорости окисления спиновой ловушки CP-N в нитроксильный радикал CP

Г	Г + ФТМ	Г + СОД	Г + ДОФА	Г + Д
16,0 ± 9,1	3,2 ± 1,2	16,8 ± 10,0	44,3 ± 16,5	4

n = 14; *P* < 0,01

Причем добавление ДОФА в лимфу приводило к достоверному увеличению скорости образования КР. В тоже время, не выявили ингибирования этого процесса после добавления СОД. Учитывая, что в гемолимфе различных насекомых, в том числе и у *Lepidoptera*, имеется эндогенная СОД [60], можно предположить, что добавление СОД к реакционной смеси не приведет к видимому ингибированию окисления ловушки. Следовательно, мы не можем полностью исключить возможность образования супероксид аниона в гемолимфе насекомых. Скорость окисления СР-Н в интактной лимфе и с ДОФА значительно снижается при добавлении специфического ингибитора фенолоксидазы - фенилтиомочевины (ФТМ) (табл. 1,2). Эти данные показывают, что окисление СР-Н в гемолимфе может происходить под действием метаболитов фенолоксидазной системы (профенолоксидазный каскад). В суспензии гемоцитов моли и шелкопряда мы не обнаружили окисления СР-Н, но при добавлении ДОФА зарегистрировали окисление этой ловушки (табл. 3,4).

Таблица 3

Образование КР в гемоцитах (Гц) сибирского шелкопряда *D.sibiricus*, измеренное по скорости окисления спиновой ловушки СР-Н в нитроксильный радикал СР

Гц	Гц + СОД	Гц + ДОФА	Гц + ФТМ+ ДОФА	Гц + Д
4,9 ± 2,0	4,8 ± 1,95**	6,4 ± 2,6***	5,0 ± 2,0*	5,

* $P < 0,01$ vs. Гц + ДОФА; ** $P > 0,05$ vs. Гц; *** $P < 0,05$ vs. Гц; $n=8$

Таблица 4

Образование КР в гемоцитах (Гц) сибирского шелкопряда *G.mellonella*, измеренное по скорости окисления спиновой ловушки СР-Н в нитроксильный радикал СР

Гц	Гц + СОД	Гц + ДОФА	Гц + ФТМ+ ДОФА	Гц + Д
2,2 ± 1,1	4,2 ± 0,2	4,15 ± 1,4*	2,3 ± 1,0***	3,

* $P < 0,05$ vs. Гц; ** $P > 0,05$ vs. Гц + ДОФА; *** $P < 0,05$ vs. Гц + ДОФА; $n=11$

ФТМ и СОД ингибировали ДОФА-индуцибельное окисление СР-Н гемоцитами личинок *D.sibiricus*, но не гемоцитами *G.mellonella*. Также не

зарегистрировали изменения продукции КР в гемоцитах под действием ЛПС и зимозана. Для того, чтобы установить вид КР в гемолимфе изучаемых насекомых к реакционной смеси добавили каталазу и DMSO (ловушка для пероксинитрита). Мы не обнаружили влияния этих добавок на окисление СР-Н, что указывает на отсутствие образования в гемолимфе пероксинитрита и H₂O₂ этих насекомых. Однако, это не исключает возможности образования пероксинитрита в гемолимфе других видов насекомых. Так в гемоцитах личинок *Estigmene acraea* зарегистрировали активность NO-синтазы [287]. В некоторых случаях H₂O₂ может образовываться в лимфе в результате различных реакций связанных с фенолоксидазой (ФО). Так, в личинках мух *S.peregrina* ФО может взаимодействовать с N-b-аланил-3,4-дигидрооксифенилаланином и глутатионом, при этом образуется N-b-аланил-5-S-глутатионил-3,4-дигидрооксифенилаланин (5-S-GAD) [184]. Подобный продукт ферментативной реакции обладает антибактериальной активностью. Авторы установили, что антибактериальная активность 5-S-GAD опосредована продукцией H₂O₂. Механизм образования перекиси не ясен, хотя не исключено, что 5-S-GAD взаимодействует со специфическими бактериальными оксидазами (возможно терминальными оксидазами респираторной цепи) [184].

Таким образом, в гемоцитах насекомых зарегистрированы ферментные системы, способные продуцировать высокореакционные соединения кислорода, которые могут иметь существенное значение при цитотоксических реакциях во время формирования клеточного иммунитета насекомых. Существенное значение в цитотоксических реакциях приобретают промежуточные продукты меланогенеза, которые за счет гидрофильных взаимодействий могут локализоваться в пределах места протекания реакции. Например, в районе повреждения кутикулы или образовании капсулы в гемоцеле. Данные соединения могут связываться с различными белками, в том числе и с коагулогенами, или с вновь образованным меланином на поверхности капсулы (гранулы) [215]. Не связанные продукты, вероятно, нейтрализуются под действием антиоксидантных систем (как неферментативных, так и ферментативных). Процесс локализации высокореакционных соединений играет значительную роль у насекомых, т.к. они имеют открытую кровеносную систему. Свободное распространение КР в организме может привести к гибели не только проникшего агента, но и особи. Одновременное функционирование в организме насекомого систем, продуцирующих КР, так и антиоксидантных систем, позволяет предотвратить развитие различных микроорганизмов, проникших в гемоцель и, в тоже время, не привести к тотальной интоксикации и, соответственно, к смерти. К сожалению, функционирование данных систем у насекомых к настоящему времени изучено недостаточно полно.

** Нитросиний тетразолиевый также используется в спектрофотометрических методах*

*** Окисление люминола и других веществ этого типа приводит к образованию электрон-возбужденных карбонильных хромофоров с высоким квантовым выходом (высокая фотохимическая эффективность) и может быть использована в качестве чувствительного теста при изучении метаболической активности клеток, в частности нейтрофилов позвоночных при фагоцитозе [16].*

**** ФМА - форбол-миристан-ацетат, действующее начало кротонowego масла, стимулирует потребление кислорода через ГМФ-шунт, нарастание продуцирования перекисных анионов и перекиси водорода [16]*

В данном опыте использовали как гемолимфу, так и лимфу (гемолимфа свободная от клеток) и отдельно гемоциты.