

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ СИСТЕМАТИКИ И ЭКОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ**

На правах рукописи

Крюкова Наталья Анатольевна

**ВЛИЯНИЕ ПАРАЗИТИЧЕСКОЙ ИНВАЗИИ НА ФОРМИРОВАНИЕ
КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НАСЕКОМЫХ НА ПРИМЕ-
РЕ ЛИЧИНОК СТРЕКОЗ РОДА *AESCHNA* (ОТРЯД *ODONATA*)**

03.00.09. – энтомология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени кандидата биологиче-
ских наук**



Новосибирск – 2005

Работа выполнена в лаборатории патологии насекомых Института Систематики и Экологии Животных СО РАН

Научный руководитель:

доктор биологических наук

В.В. Глухов

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Марченко В.А.

кандидат биологических наук

А.В. Симакова

Ведущее учреждение: Санкт - Петербургский Государственный Аграрный Университет

Защита состоится *20* декабря 2005 года в *10* часов на заседании диссертационного совета Д 003.033.01 в Институте Систематики и Экологии Животных СО РАН по адресу 630091 , г. Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 11.

Отзывы на автореферат диссертации в двух экземплярах, заверенные печатью учреждения, просим направлять по адресу: 630091 , г. Новосибирск, ул. Фрунзе, д. 11, Диссертационный совет ИСиЭЖ СО РАН. Факс: (383) 2170973, e-mail: mi@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института Систематики и Экологии Животных СО РАН

Автореферат разослан « . » ноября 2005г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор биологических наук,

профессор



А.Ю. Харитонов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. К настоящему времени существует большое количество работ по морфологии, систематике и экологии стрекоз, но по изучению иммунного ответа, в частности, клеточного, имеются единичные работы. Известно, что личинки стрекоз могут выступать в роли дополнительных хозяев для трематод (Судариков и др., 2002; Genov and Samnaliev., 1984). Вполне закономерно, что гибель личинок может привести к элиминации паразита из ценоза. Для сохранения в промежуточном хозяине, паразиту необходимо с одной стороны избежать воздействия иммунной системы, с другой – предотвратить возникновение вторичных инфекций. Проникновение чужеродного объекта в гемоцель насекомого приводит к активации всех защитных систем организма хозяина. На первых этапах формирования иммунного ответа насекомых важную роль играет клеточный иммунитет, ключевыми клетками которого являются свободноциркулирующие клетки лимфы – гемоциты. Последние взаимодействуют с проникшими в гемоцель инородными объектами и участвуют в различных иммунных реакциях. Существенную роль в распознавании инородных объектов гемоцитами играют лектины, которые могут присутствовать как на поверхности гемоцитов, так и в лимфе. Лектины являются так называемыми паттерн-распознающими молекулами и могут инициировать активацию профенолоксидазного каскада (ПФК) и гранулообразование (Chen et al., 1995; Lee et al., 1999; Yu et al., 2002). При капсулообразовании вокруг паразита синтезируется меланин. Во время меланизации могут образовываться хиноны и семихиноны, обладающие цитотоксическими свойствами. В ходе сопряженной эволюции паразиты выработали множество защитных механизмов, способствующих избеганию или подавлению иммунных реакций хозяина (Сапрунов, 1987; Vinson, 1990; Brehélin, 1990; Strand, Pech, 1995; Hochuli et al., 1999; Kinuthia et al., 1999). Одним из таковых является «молекулярная мимикрия», при которой поверхностные компоненты паразита не распознаются иммунной системой хозяина (Сапрунов, 1987; Vinson, 1990). В ряде случаев паразиты могут активно воздействовать на иммунитет хозяина, подавляя или частично блокируя его. В первую очередь подавляется активность клеточного иммунного ответа, а также профенолоксидазный каскад (Vinson, 1990; Brehélin, 1990; Lavine, Beckage, 1995; Kinuthia et al., 1999; Shelby et al., 2000; Bell et al., 2003). К настоящему времени существует незначительное количество работ по влиянию паразитов на иммунную систему насекомых. Основные исследования, как правило, проводятся на паразитоидах, которые, как установлено, в основном подавляют активность гемоцитов и запуск триггерных механизмов, активирующих ПФК (Rizki et al., 1990.1991; Carton et al., 2000; Rivers et al., 2002, 2003). Отсутствуют работы по изучению влияния паразитов, в частности трематод,



на формирование иммунного ответа стрекоз, об участии в данном процессе гемоцитов; изучению возникновения бактериозов на фоне паразитической инвазии. Кроме того, отсутствуют работы по морфо-функциональному описанию гемоцитов стрекоз; не изучались лектины и лектиноподобные соединения гемолимфы стрекоз.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось изучение влияния паразитической инвазии на формирование клеточного иммунного ответа насекомых на примере личинок стрекоз рода *Aeschna* (отряд *Odonata*).

Соответственно, были поставлены следующие задачи:

1. Идентификация гемоцитов исследуемых насекомых с использованием морфологических и цитохимических критериев.
2. Изучение агглютининов гемолимфы личинок стрекоз рода *Aeschna* и выявление гемоцитов, участвующих в синтезе агглютининов.
3. Изучение паразитофауны личинок стрекоз рода *Aeschna* Новосибирской области.
4. Изучение влияния паразитической инвазии на формирование клеточного иммунного ответа личинок стрекоз при моделировании вторичной инфекции.

Научная новизна: Впервые был изучен и описан типовой состав гемоцитов личинок стрекоз рода *Aeschna*. Помимо морфологических критериев в работе по идентификации клеток гемолимфы, были использованы цитохимические и иммунохимические маркеры, а также зонд на внутриклеточный кальций (хлортетрациклин). Впервые было изучено влияние трематод семейств *Plagiorhidae* и *Prosthogonimidae* на клеточные иммунные реакции личинок стрекоз *A. grandis*, являющихся их промежуточными хозяевами. Были выделены агглютинины гемолимфы личинок стрекоз, а также зарегистрирована экспрессия лектиноподобных белков в гемоцитах. Впервые были выделены бактерии персистирующие в гемолимфе и гемоцитах стрекоз. Данные бактерии при повышении температуры окружающей среды, способны вызывать гибель личинок стрекоз. Впервые было зарегистрировано паразитирование микроспоридий в жировом теле личинок стрекоз рода *Aeschna*, обитающих в водоемах России. Микроспоридии были отнесены к виду *Systemosterma alba*.

Научно-практическая значимость. Представленные результаты вносят вклад в дальнейшее понимание механизмов формирования иммунных реакций беспозвоночных при наличии паразитической инвазии. Были разработаны подходы для оценки состояния клеточного иммунитета личинок стрекоз при паразитической нагрузке. Представленные в

работе результаты по эндоцитобионтам и паразитическим простейшим, вносят вклад в накопление данных о паразитофауне стрекоз рода *Aeschna*.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на Всероссийской конференции «Беспозвоночные животные Южного Зауралья и сопредельных территорий» (Курган, март 1998), на конференции «Паразит в природных комплексах и рисковые ситуации» (Новосибирск, июнь 1998), на VI Европейском энтомологическом конгрессе (Чехия, август 1998), на конференции «Взаимоотношения паразита и хозяина» (Москва, декабрь 1998).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста; состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 19 рисунками и 1 таблицей. Список литературы включает 187 работ, из которых 156 на английском языке.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность д.б.н. В.В. Глупову за руководство научной работой, к.б.н. Л.И. Бурцевой за предоставленные штаммы *Bacillus thuringiensis*, к.б.н. В.П. Ходыреву за помощь при определении микробиологического материала, к.б.н. Н.И. Юрловой за помощь при определении паразитологического материала, к.б.н. Ю.Я. Соколовой за помощь при идентификации паразитологического материала и проведение электронной микроскопии, к.б.н. И.М. Дубовскому и к.б.н. В.В. Мартемьянову за помощь при проведении исследований, к.б.н. С.А. Бахвалову и к.б.н. М.Ф. Хвощевской за обсуждение рукописи и ценные критические замечания.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Глава 1. Литературный обзор

В главе рассматриваются основные звенья клеточного и гуморального иммунного ответа насекомых, таких как: фагоцитоз, капсулообразование, коагуляция лимфы, профеноксидазный каскад и система генерации активированных кислородных метаболитов. Рассматриваются ключевые аспекты воздействия паразитарной инвазии на иммунные реакции хозяина-насекомого.

Глава 2. Материалы и методы исследования

Насекомые.

В работе использовали личинок стрекоз 7-8 возраста рода *Aeschna* (*A. grandis*, *A. viridis*). Личинки были собраны в водоемах Колыванской и Новосибирской области в период с конца мая до середины июня.

Паразитологический анализ. Паразитологический анализ проводили по общепринятой методике, с последующим подсчетом количества цист в одной особи, учитывая их месторасположение и наличие меланизации на поверхности цист. В дальнейшем проводили определение метацеркарий до семейства. Личинки стрекоз, несущие дополнительную паразитическую нагрузку, помимо трематод, из опыта исключались.

Сбор гемолимфы и получение суспензии гемоцитов. Гемолимфу собирали в пластиковые пробирки (1,5мл), прокалывая стернитную пластинку восьмого сегмента брюшка личинки. Для предотвращения меланизации на дно пробирки помещали кристаллик фенилтиомочевины (ФТМ). Затем образцы центрифугировали при 500 g в течение 5 минут и надосадочную жидкость при 4000 g на протяжении 5 минут. Супернатант использовали для дальнейших исследований. Для получения суспензии гемоцитов гемолимфу собирали в пластиковые пробирки с охлажденным (+4°C) антикоагулянтом (АК) (Leonard et al., 1985). Затем гемолимфу центрифугировали 5 мин при 500 g, полученный осадок ресуспензировали и гемоциты трижды отмывали в холодном АК и один раз в 0,01M фосфатном буфере pH 7.2 с 150mM NaCl (ФБ).

Идентификация типов гемоцитов при помощи световой микроскопии. Идентификация гемоцитов проводилась в фиксированных этанолом и окрашенных азур-эозином мазках гемолимфы. При идентификации типов гемоцитов пользовались классификацией, адаптированной из работ Gupta (1979), Ratcliffe (1982), Brechelin, Zachary (1986). Кроме того, для идентификации гемоцитов был использован зонд на внутриклеточный кальций – хлортетрациклин (ХТЦ). В работе использовали среду Грейса. Измерение интенсивности флуоресценции комплекса Ca^{2+} -ХТЦ регистрировали с помощью микроскопа «Люмам - И2». Интенсивность флуоресценции измеряли в относительных единицах по показанию вольтметра как разность флуоресценции клетки и фона, уровень которого постоянно регистрировали при измерениях.

Флуорохромирование растительных лектинов и использование их в идентификации гемоцитов. Растительные лектины – конканавали А (Con A) и фитогемагглютинин (ФГА), метили флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). Конъюгированные ФИТЦ лектины инку-

бировали с отмытой суспензией гемоцитов или монослоем гемоцитов в течение 40 мин., затем клетки промывали ФБ и микроскопировали, используя микроскоп «Люмам – И2».

Определение агглютинирующей активности гемолимфы. Реакцию агглютинации проводили согласно методике Зигль (1980). В опытах по определению агглютинирующей активности использовали эритроциты человека различных групп крови. В качестве ингибиторов использовали растворы 10мМ, 20мМ ЭДТА и 200 мМ различных углеводов.

Получение фракций гемолимфы с агглютинирующей активностью Лимфу личинок стрекоз разделяли с помощью гель-фильтрации на колонке (1 x 30 см) с Toyopearl HW-55 (Toyo Soda MFG. CO. Ltd.) в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7,5 с 150 мМ NaCl. Полученные активные фракции использовали в дальнейшей работе.

Получение поликлональной антисыворотки к агглютининам гемолимфы. При получении поликлональной антисыворотки придерживались рекомендаций Amirante, Mazzalai (1978) с незначительными изменениями. Активные фракции гемолимфы, полученные с помощью гель-фильтрации, инкубировали с эритроцитами человека (10^8 клеток/мкл) 2 часа при температуре 22 ± 2 °С. Затем эритроциты трехкратно отмывали в ФСБ и использовали 10 %-ю суспензию для иммунизации кроликов.

Выявление агглютининов в гемоцитах. Для выявления агглютининов в гемоцитах использовали иммуноферментный метод (Полак, Ван Норден, 1987). В качестве первых антител использовали иммуноглобулины кролика, полученные в результате разделения сыворотки на сефарозе, конъюгированной с белком А. В качестве вторых антител использовали козы антигела, конъюгированные с пероксидазой. Далее, монослои инкубировали в ФБ с 0,5 мг/мл 3,3-диаминобензидина тетрагидрохлорида (ДАБ), содержащем 0,03 % H_2O_2 .

Электронная микроскопия гемоцитов. Для электронной микроскопии гемоциты были фиксированы в 2,5 % глутаровом альдегиде. Затем гемоциты дегидрировали в серии градиента ацетона и помещали в смесь смол эпон-аралдит. Ультратонкие срезы были проанализированы в электронном микроскопе Hitachi -300 EM.

Выделение бактерий из гемоцитов. Для выделения бактерий, предварительно отмытые гемоциты, гомогенизировали в 0,05 М фосфатном буфере рН 7,4 и центрифугировали при 15000 g в течение 15 мин. Полученный осадок помещали непосредственно на триптозный агар (Ferak, Berlin) в чашках Петри. Чашки инкубировали при температуре 28 °С 48 часов, затем бактерии были идентифицированы по определителю Берджи (1997).

Аффинная хроматография. Для приготовления аффинного сорбента бром-циан активированную Сефарозу 4В (Sigma) конъюгировали с IgG кролика согласно Харрисону, Итину (Harrison, Itin, 1980). Сывороточные IgG кролика были очищены согласно Трукко, де Петрис (1983). При проведении аффинной хроматографии использовали фракции гемолимфы с агглютинирующей активностью, полученные после гель-фильтрации.

Электрофоретическое разделение белков. Электрофоретическое разделение белков проводили как в денатурирующих условиях, так и без детергентов по модифицированной методике Laemmli (1970). При разделении белков в денатурирующих условиях (в присутствии додецилсульфата натрия - SDS) использовали 15% разделяющий и 4,5% концентрирующий гели (PAGE-SDS). При проведении электрофореза без детергентов, использовали 7% разделяющий и 4,5% концентрирующий гели. Во всех вариантах в качестве маркеров молекулярной массы использовали белковые стандарты (Sigma). Количество белка в образцах определяли по методу Лоури с сопр. (Lowry et al., 1951), в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (БСА).

Электрофоретический перенос в сочетании с иммуноферментным анализом. Белки, разделенные с помощью PAGE-SDS, электрофоретически переносили с геля на нитроцеллюлозный фильтр (Hybon-C, размер пор 0,45 мкм, Amersham, England) по методу Towbin et al (1979) с некоторыми изменениями. Для выявления агглютининов лимфы использовали иммуноферментный метод (Полак, Ван Норден, 1987).

Инъецирование стрекоз бактериальными клетками и суспензией сефадекса. Личинкам инъецировали 12 мкл суспензии сефадекса ДЕАЕ – 25 (1мг/мл) и по 4 мкл суспензии вегетативных клеток *Bacillus thuringiensis s.s.p.galleria* 69-6 (10^6 клеток/мл) и *Escherichia coli* K-12 (10^7 клеток/мл). Бактерии были предварительно убиты формалинглутаровым фиксатором (1.6% формалина, 0.25% глутарового альдегида в ФБ). Сефадекс трижды отмывали в ФБ. Инъецирования проводили с помощью микродозатора под 8 стернит брюшка.

Инъецирование стрекоз цистами трематод. Личинкам стрекоз *poda Aeshna* инъецировали в гемоцель цисты трематод семейства *Plagiorchiidae* и *Prosthogonimidae*. Цисты были предварительно извлечены из тканей личинок стрекоз различных таксонов, в том числе, относящихся к другим семействам. Цисты промывали в ФБ и инъецировали в прокол под седьмым стернитом. Наблюдения за процессом инкапсуляции проводили через 4, 24, 48 и 72 часа. Для инъецирования использовали стеклянный капилляр.

Регистрация фенолоксидаз в клетках. Выявление фенолоксидаз в гемоцитах личинок стрекоз проводили на фиксированных ацетоном монослоях клеток. Субстратом для фер-

мента служил dl-дигидроксифенилаланин (ДОФА). Монослой клеток инкубировали 1 час с 4 мг/мл ДОФА в ФБ.

Регистрация активированных кислородных метаболитов в клетках крови. Образование активных форм кислорода в клетках крови стрекоз регистрировали по восстановлению нитросинего тетразолия (НСТ), используя методику Дуглас и Кун (1983) с незначительными изменениями. Стекла с монослоями инкубировали 1 час при температуре 37 °С в ФБ с 1.7 мг/мл НСТ. Затем клетки фиксировали формалин-глутаровым фиксатором.

Статистическую значимость различий определяли по t - критерию Стьюдента .

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Морфофункциональная дифференциация гемоцитов

У личинок стрекоз последнего возраста *A. grandis* и *A. viridis* при помощи световой микроскопии на основе морфологических критериев было выделено три основных типа гемоцитов: прогемоциты (Pr), гранулоциты (Gr) и плазматоциты (Pl). У личинок стрекоз выделяется три подтипа плазматоцитов: PL₁ - веретенновидные клетки (5-10 мкм x 20 -40 мкм), PL₂ - клетки по форме напоминающие инфузорию-туфельку (10-15 мкм x 35-40 мкм) и PL₃ - округлые крупные клетки (15-20 мкм x 20-25 мкм). При более детальном изучении гемоцитов с помощью электронной микроскопии, было выявлено, что гранулоциты можно разделить на два подтипа: округлые Gr₁(8-10 мкм x 8-15 мкм) и вытянутые Gr₂(8-10 мкм x 15-20 мкм). При использовании цитохимических методов были получены следующие результаты. Активность фенолоксидазы была зарегистрирована в Gr, Pl₁ и Pl₃, общее количество фенолоксидазоположительных гемоцитов было в пределах 7 - 15 %. За исключением Pl₂, эстеразную активность отмечали практически во всех типах гемоцитов (6-13 %) в виде диффузно-распределённых в цитоплазме гранул. Наиболее интенсивно окрашивались Gr и Pr. Восстановление нитросинего тетразолия (НСТ), как показателя окислительного метаболизма клетки, было зарегистрировано в гранулоцитах и во всех подтипах плазматоцитов, причем наиболее интенсивное образование формазана фиксировали в Pl₁ и Pl₃. Общее количество НСТ-положительных гемоцитов составило 2-7 %.

Кроме того, в работе использовали зонд на внутриклеточный кальций – хлортетрациклин (ХТЦ), который связывается с кальцием и с каким-либо компонентом клетки (мембраны, АТФ и т.д.) (Добрецов, 1989). Наиболее яркое свечение регистрировалось у гранулоцитов и прогемоцитов, для которых характерно сильное свечение цитоплазмы. Вероятно, это связано с большим количеством митохондрий, эндоплазматическим ретикулулом и других структур, в значительной мере развитых в клетках с высокой метаболической активностью. Промежуточное положение по интенсивности свечения заняли

плазматоциты. Ионы кальция играют немаловажную роль в физиологии клетки, участвуя в механизмах, контролирующих рост и дифференциацию клеток. Таким образом, использование данного метода, позволяет судить о степени зрелости клеток и предположительно, об их иммунной активности. Использование иммуноферментных маркеров позволяет судить о возможной роли того или иного типа гемоцитов при протекании иммунного ответа.

Основываясь на результатах морфологического и цитохимического анализа мы можем говорить об уникальности популяции гемоцитов стрекоз рода *Aeschna* (*A. grandis*, *A. viridis*). В первую очередь, размеры гемоцитов стрекоз в несколько раз превышают размеры клеток крови многих видов насекомых. Во-вторых, такие типы клеток как сферулоциты и энцитойды, характерные для *Lepidoptera* и *Coleoptera* у стрекоз не были отмечены. Результаты цитохимического анализа позволяют предположить, что Pl_1 и Pl_3 наряду с G_1 принимают наиболее активное участие в клеточном иммунном ответе.

3.2. Агглютинины

У личинок стрекоз рода *Aeschna* была зарегистрирована агглютинирующая активность в гемолимфе, а также экспрессия лектиноподобных белков в гемоцитах. Определение агглютинирующей активности проводили в лимфе, методом двойного разведения. Титр агглютинации эритроцитов человека различных групп крови нативной лимфой личинок стрекоз составил $10 (\log_2 \text{титр}^{-1})$. Следует отметить, что агглютинация эритроцитов в гемолимфе личинок стрекоз не ингибировалась при добавлении ЭДТА (20мМ). Из чего следует, что для проявления активности агглютининов не обязательно наличие ионов кальция и магния (Ca/Mg –независимые).

При разделении гемолимфы с помощью гельфильтрации, была получена фракция с агглютинирующей активностью (Рис. 1). Молекулярный вес агглютинина при электрофоретическом разделении в полиакриламидном геле с использованием детергентов (SDS), составил около 90 kDa. Электрофоретическое разделение без использования детергента, показало, что молекулярная масса нативного агглютинина составляет примерно 380 – 390 kDa. Возможно, молекула агглютинина состоит из 4-х субъединиц. При иммунизации кроликов эритроцитами человека, которые ранее инкубировали с очищенной фракцией гемолимфы *A. viridis*, была получена поликлональная сыворотка к белкам, которые связались с поверхностью эритроцита. После выделения из поликлональной сыворотки иммуноглобулинов, был проведен иммуноблоттинг, а также иммуногистохимический анализ. При иммуноблоттинге с использованием полученных иммуноглобулинов, были выявлены субъединицы с молекулярным весом 90 kDa как у *A. grandis* так и у *A. viridis*, которые

соответствовали пику гель-фильтрации (Рис. 1). При дальнейшей очистке агглютининов с помощью ионообменной и аффинной хроматографии, полученные фракции теряли активность. Возможно, что для нормального функционирования молекулы агглютинаина, необходимо наличие каких-либо белков, способных стабилизировать их конфигурацию, необходимую для взаимодействия с тест-объектами. При иммуногистохимическом анализе агглютинины были выявлены в клетках лимфы личинок стрекоз. В основном окрашивались Gt и P₃. Общее количество окрашенных клеток составило от 17 до 28 %.

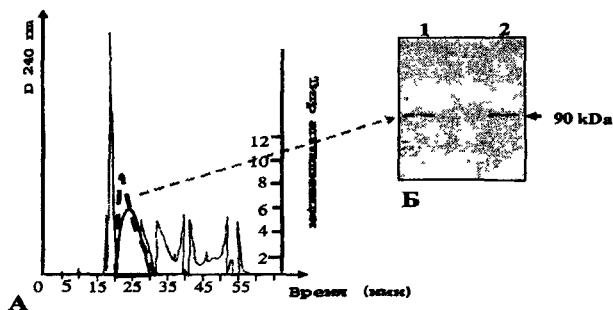


Рис. 1 А - Гель-фильтрация гемолимфы личинок стрекоз *A. grandis* на TOYO-SODA WH-75. Агглютинирующая активность — — — — —, Оптическая плотность при 240 nm — — — — —. Б - Иммуноблоттинг с использованием поликлональных кроличьих антител против сывороточных агглютининов гемолимфы *A. grandis* (1) и *A. viridis* (2).

Наряду с паттерн-распознающими белками лектины способны обуславливать активацию таких процессов как фагоцитоз, капсуло- и гранулообразование (Pendland, Boucias, 1996; Wilson et al., 1999; Tojo et al., 2000; Beatty et al., 2002; Yu, Kanost, 2003; Wang et al., 2004). В организме насекомых агглютинины могут участвовать в процессах элиминации чужеродного материала и коагуляции гемолимфы (Lavine, Strand, 2002; Theopold, Schmidt, 1997; Yu, Kanost, 2003; Li et al., 2002). У личинок стрекоз рода *Aeschna*, регистрировали высокую коагулирующую активность гемолимфы, наряду с высокой адгезивной активностью гемоцитов. Добавление в лимфу бактериальных клеток или эритроцитов человека, приводит к практически моментальному клампированию клеток. Коагуляцию лимфы регистрировали и при отсутствии инородных тел. Высокая коагулирующая активность лимфы и высокая способность гемоцитов к клампообразованию, вероятно, позволяют личинкам стрекоз избежать большой кровопотери и дальнейшего заражения.

3.3. Паразиты личинок стрекоз рода *Aeschna*

3.3.1. Бактериальные инфекции

В гемоцитах личинок стрекоз рода *Aeschna* последнего и предпоследнего возрастов регистрировали бактерии (эндоцитобионты). Понятие эндоцитобионты, включает в себя широкий спектр как паразитических, так и симбиотических внутриклеточных микроорганизмов, оказывающих определенное влияние на физиологический статус хозяина. Эндоцитобионты гемоцитов стрекоз относятся к роду *Pseudomonas*. Данные бактерии определить до вида не удалось, в связи с трудностью культивирования на классических питательных средах. Электронная микроскопия показала, что эндоцитобионты плеоморфны, их форма и размер варьирует от сферического до бесформенного, 1-2 мкм в диаметре. Эндоцитобионты в инфицированных клетках представлены как единичными клетками микроорганизмов, так и формируют кластеры, погруженные в аморфный матрикс неопределенной природы и могут быть покрыты многослойным матриксом. Группы или единичные клетки бактерий, окруженные волокнисто-подобной оболочкой, регистрировали только в цитоплазме клеток иммунокомпетентного звена – плазматоцитах и в меньшей мере в гранулоцитах.

Нами было установлено, что повышение температуры окружающей среды выше 32 °С, приводит к гибели личинок стрекоз от *Pseudomonas*. Смертность может составлять от 70 до 90%. Возможно, что резкое повышение температуры окружающей среды индуцирует развитие бактерий. Какова роль выявленных микроорганизмов в жизнедеятельности стрекоз – не ясно. Возможно, стрессовые ситуации стимулируют рост количества бактерий рода *Pseudomonas*, что в итоге приводит к гибели хозяина. Наличие данных бактерий, вероятно, можно рассматривать как один из факторов регуляции численности стрекоз.

3.3.2 Микроспоридии

В клетках жирового тела личинок стрекоз *Aeschna viridis* были обнаружены микроспоридии. Основываясь как на морфологии спор, так и на видовой принадлежности хозяина, микроспоридии были отнесены к виду *Systemostrema alba*. Экстенсивность заражения составляла около 3,5%. Ранее, Larsson (1988) описывал этот вид паразита у личинок стрекоз *Aeschna grandis*, обитающих в водоемах Швеции. На территории России не регистрировали микроспоридиозной инфекции в личинках стрекоз. Влияние паразитирования микроспоридий на иммунный ответ личинок стрекоз, проследить не удалось, в связи с низким процентом зараженности природной популяции и невозможностью вторичного заражения.

3.3.3. Трематоды

В личинках стрекоз рода *Aeschna* регистрировали высокий процент заражения трематодами семейства *Plagiorhidae* и *Prosthogonimidae*. В зависимости от места и времени сбора, процент зараженности мог составлять от 50 до 89 % ($p < 0,05$) от общего числа исследуемых личинок. Около 30% ($p < 0,05$) цист были покрыты меланизированной оболочкой, тем не менее, личинка трематоды оставалась жизнеспособной.

Для выяснения возможного влияния инцистированных метацеркарий на протекание клеточного иммунного ответа стрекоз *A. grandis* и *A. viridis*, в гемоцель личинок инъецировали суспензию убитых бактериальных клеток *B. thuringiensis s.s.p.galleria* или *E. coli*. Также в гемоцель инъецировали суспензию сефадекса. Через сутки после инъецирования сефадекса у исследуемых личинок регистрировалось образование крупных меланизированных гранул (капсул), локализованных преимущественно в пределах поврежденной кутикулы и прикрепленных к мышцам брюшка, трахеям и жировому телу. При инъецировании в гемоцель личинок стрекоз суспензии бактериальных клеток, уже через 4 часа отмечали единичные гранулы в теле насекомого, которые локализовались в основном в жировом теле около кишечника. Таким образом, цисты трематод не блокируют грануло- и капсулообразование. Кроме того, как зараженным метацеркариями, так и не зараженным личинкам стрекоз, инъецировали в гемоцель цисты трематод семейств *Plagiorchidae* и *Prosthogonimidae*. Цисты были предварительно извлечены из тканей личинок стрекоз *A. grandis*, *A. viridis*, а также из личинок стрекоз относящихся к другим родам (*Cordulia aenea*, *Epiteca bimaculata*). Инкапсуляцию цист не регистрировали в гемоцеле *A. grandis* и *A. viridis* в течение 3-х суток независимо от вида предыдущего хозяина и зараженности реципиента метацеркариями трематод. Однако, определенные участки на поверхности инъецируемых цист были меланизированными. Меланизации подвергались в основном остатки тканей предыдущего хозяина. Возможно, что поверхностный слой метацеркарий содержит соединения различной природы, позволяющие избежать паразиту распознавания иммунной системой хозяина. Не исключено, что в поверхностный слой цист входят протеогликаны – белки с большим содержанием углеводных остатков, которые и образуют своеобразный «камуфляжный слой».

Одновременно, после инъецирования убитых бактериальных клеток *B. thuringiensis s.s.p.galleria* или *E. coli*, в гемоцель не инвазированных личинок стрекоз *A. grandis*, регистрировали резкое повышение НСТ-положительных клеток до 17% ($p < 0,05$) с последующим спадом до контрольных значений в течение трех суток (Рис.2). У личинок, зараженных трематодами, количество НСТ-положительных клеток незначительно увеличивалось

до 8% ($p \leq 0,05$) с последующим спадом до контрольных значений на протяжении суток, и в дальнейшем оставалось стабильным (6%) (Рис. 3).

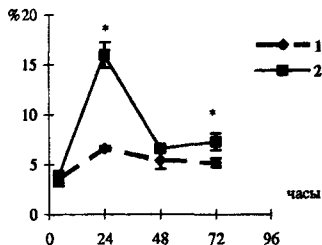


Рис. 2 Динамика НСТ-положительных клеток *A. grandis*, не инвазированных трематодами при инъекцировании *B. thuringiensis*; * - $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем

1-контроль, 2-инъекционные

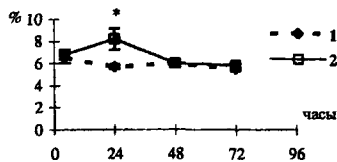


Рис. 3 Динамика НСТ-положительных гемоцитов личинок *A. grandis*, инвазированных трематодами при инъекцировании *B. thuringiensis*; $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем

1- контроль, 2- инъекционные

При инъекцировании личинкам, как содержащим метацеркарии, так и без метацеркарий, суспензии клеток *B. thuringiensis* через 4 часа регистрировали подъем ФО-положительных клеток до 25% ($p \leq 0,05$), с последующим снижением до 5-6% на первые сутки у не инвазированных личинок (Рис.4) и до 11% у личинок зараженных трематодами (Рис. 5). В дальнейшем количество ФО-положительных клеток отличалось у личинок зараженных и не зараженных трематодами. Так, у инвазированных личинок стрекоз количество ФО-положительных клеток не изменялось в течение трех суток после инъекцирования бактериальной суспензии (Рис. 5).



Рис. 4 Динамика ФО - положительных гемоцитов личинок *A. grandis* не инвазированных трематодами, при инъекцировании *B. thuringiensis*. * - $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем

1-контроль, 2-инъекционные

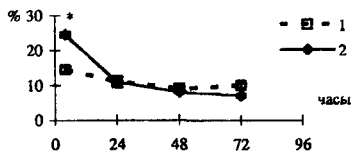


Рис.5 Динамика ФО- положительных гемоцитов личинок *A. grandis*, инвазированных трематодами, при инъекцировании *B. thuringiensis*;

* - $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем

1- контроль 2- инъекционные

В то же время, инъекция бактерий в гемоцель не инвазированным личинкам приводило к резкому увеличению ФО-положительных гемоцитов на вторые сутки до 17% ($p \leq 0,05$) (Рис.4). Следует отметить, что у личинок зараженных трематодами, изначально были более высокие контрольные значения как НСТ-положительных, так и ФО-положительных клеток лимфы (Рис. 3, 5), но отличия между инвазированными и неинвазированными личинками в контроле были не достоверны.

У личинок стрекоз *A. grandis* и *A. viridis*, зараженных цистами трематод семейства *Plagiorchiidae* и *Prosthogonimidae*, отмечали изначально более высокую ферментативную активность в гемоцитах. Однако, это не приводило к уничтожению или элиминации паразитов. В то же время, при инфекционной нагрузке, иммунная система хозяина не способна реагировать на проникновение чужеродного тела в полной мере, в отличие от интактных личинок. Можно предположить, что паразит подавляет иммунные реакции организма до уровня безопасного для его существования, но не снижает иммунного статуса насекомого-хозяина до критического уровня.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевую роль в формировании иммунного ответа насекомых играют клетки лимфы (гемоциты) и, в первую очередь, клетки иммунокомпетентного звена – гранулоциты и плазматоциты. Популяция гемоцитов неоднородна, что может быть связано как с различной степенью зрелости клеток, так и с многообразием функций, выполняемых ими. Соотношение тех или иных типов гемоцитов может изменяться в зависимости от стадии развития и физиологического состояния, а также от вида насекомого (Gupta, 1979; Ratcliffe, White, 1982; Lackie, 1988). У личинок стрекоз последнего возраста *A. grandis* и *A. viridis* было выявлено уникальное среди насекомых соотношение гемоцитов. Следует особо отметить необычно крупные размеры гемоцитов личинок стрекоз рода *Aeschna*, а также отсутствие таких типов клеток как эноциты и сферулоциты, широко представленные у различных видов насекомых.

О степени зрелости клеток и их функциональной активности позволяет судить наличие связанного внутриклеточного кальция. Последний регистрируется с использованием зонда – хлортетрациклина (ХТЦ), который связывается с кальцием и с каким-либо компонентом клетки (мембраны, АТФ и т.д.). Интенсивность свечения в клетках крови ХТЦ-зонда, зависит от характера распределения внутриклеточного кальция. У личинок стрекоз наиболее яркое свечение регистрировалось в гранулоцитах и прогемоцитах, т.е. в

клетках для которых характерна высокая иммунная активность. О функциональной роли гемоцитов может говорить наличие в клетках таких ферментов как фенолоксидазы, эстеразы и фиксируемое с помощью нитросинего тетразолия образование активных кислородных метаболитов (АКМ). У личинок стрекоз в гранулоцитах и плазматоцитах, регистрировали наличие фенолоксидаз (ФО), эстераз и активированных кислородных метаболитов (АКМ). В прогемоцитах регистрировали весь спектр вышеперечисленных ферментов. То что в гранулоцитах и плазматоцитах были зафиксированы данные ферменты, а также генерация АКМ, вполне закономерно, поскольку эти клетки активно участвуют в иммунном ответе насекомых, а фенолоксидазы, эстеразы и АКМ могут непосредственно участвовать в уничтожении паразита. Наличие фенолоксидаз в прогемоцитах *Aeschna* – уникальное явление, так как у насекомых других отрядов данный фермент никогда ранее не регистрировали.

Немаловажную роль в процессах иммунного ответа играют лектины и лектиноподобные белки (агглютинины) лимфы и клеток крови. Агглютинины насекомых, участвуя в иммунном ответе, выполняют множество функций, действуя как рецепторные молекулы, активируя процессы клеточного иммунного ответа, а также процессы метаморфоза и регенерации (Wilson et al., 1999; Gelbič, Olejníček, 2004; Lavine, Strand, 2002; Yu, Kanost, 2003; Li et al., 2002). В гемолимфе личинок стрекоз рода *Aeschna* была выявлена агглютинирующая активность. Выделить чистый агглютинин из лимфы личинок стрекоз с помощью аффинной и ионообменной хроматографии не удалось, возможно, что молекулы агглютинина не устойчивы и для их нормального функционирования необходимо наличие каких-либо белков, способных стабилизировать их конфигурацию. При использовании иммуногистохимических методов была показана экспрессия лектиноподобных белков в гемоцитах, в основном в G1 и P1. Известно, что агглютинины являются паттерн-распознающими белками, т.е. участвуют в иммунном распознавании. Возможно, этим можно объяснить наличие лектинов на поверхности гранулоцитов и плазматоцитов, так как данный тип клеток наиболее активно участвует в иммунных реакциях, направленных на изолирование и уничтожение паразита. Кроме того, у личинок стрекоз рода *Aeschna*, регистрировали высокую коагулирующую активность гемолимфы, наряду с высокой адгезивной активностью гемоцитов. В условиях водной среды, где насекомое контактирует с большим количеством бактерий, паразитов и т.д., высокая скорость коагуляции и клампообразования вполне оправдана, так как предотвращает значительные потери гемолимфы и закрывает «ворота инфекции» при ранениях.

В данном исследовании было обнаружено редкое явление, а именно – наличие эндцитобластов в иммунокомпетентных клетках крови. Роль микроорганизмов в организме

стрекоз, остается не выясненной. Однако, учитывая высокий процент зараженности, а также то, что персистенция бактерий не оказывает значительного влияния на иммунные реакции насекомого, можно предположить симбионтный характер их взаимоотношений. Основываясь на результатах наблюдений, можно предположить, что температура может служить регулирующим фактором численности стрекоз, опосредованно через активацию эндосимбионтов. Кроме того, в процессе исследований у личинок стрекоз обнаружили паразитирование микроспоридий в жировом теле. Паразитирование микроспоридий в личинках стрекоз рода *Aeschna*, было впервые зарегистрировано на территории России. Микроспоридии были отнесены к виду *Systemostrema alba* Larsson 1988.

Личинки стрекоз также являются дополнительными хозяевами для трематод семейств *Plagiorchiidae* и *Prosthogonimidae*. В процессе эволюции у трематод вокруг цист метацеркарий сформировалась уникальная оболочка, которая не распознается иммунокомпетентным звеном насекомого. Возможно, в состав оболочки цист входит большое количество протеогликанов, для которых характерна высокая степень гликозилирования. Вероятно, концевые углеводные остатки протеогликанов, входящих в состав оболочки цист, образуют однородный слой, состоящий из моносахаров. Наличие данных соединений может обуславливать отсутствие распознавания и иммунного ответа у личинок стрекоз рода *Aeschna* при пересадке им цист, полученных из личинок других родов и семейств. При инъекции бактериальной суспензии в гемоцель насекомых, было обнаружено, что у зараженных трематодами личинок стрекоз, количество иммунокомпетентных клеток (ФО- и НСТ-положительных), вдвое меньше по сравнению с не зараженными личинками характеризующихся высоким уровнем генерации АКМ и фенолоксидазной активностью. Данное иммуносупрессивное действие трематод на клеточный иммунитет насекомых, вероятно, может быть обусловлено или частичным истощением ресурсов организма хозяина, или тем, что метаболиты паразита обладают ингибирующей активностью узкого действия, которая проявляется только при вторичной инфекции. Следует также отметить, что основные функции клеток иммунной системы стрекоз полностью не ингибируются при инвазии трематодами. Такие ключевые реакции как фагоцитоз, капсуло- и гранулообразование у инвазированных личинок наблюдаются в полной мере. Таким образом, с одной стороны паразиты не угнетают ключевые реакции иммунного ответа и приводят к повышению активности клеток иммунокомпетентного звена, с другой стороны, ответ на вторичную инфекцию не развивается в той степени, которая характерна для неинвазированной личинки. Подобное взаимодействие позволяет личинкам стрекоз инвазированных паразитами противостоять вторичному заражению, а паразиту – не быть уничтоженным иммунной системой насекомого.

ВЫВОДЫ

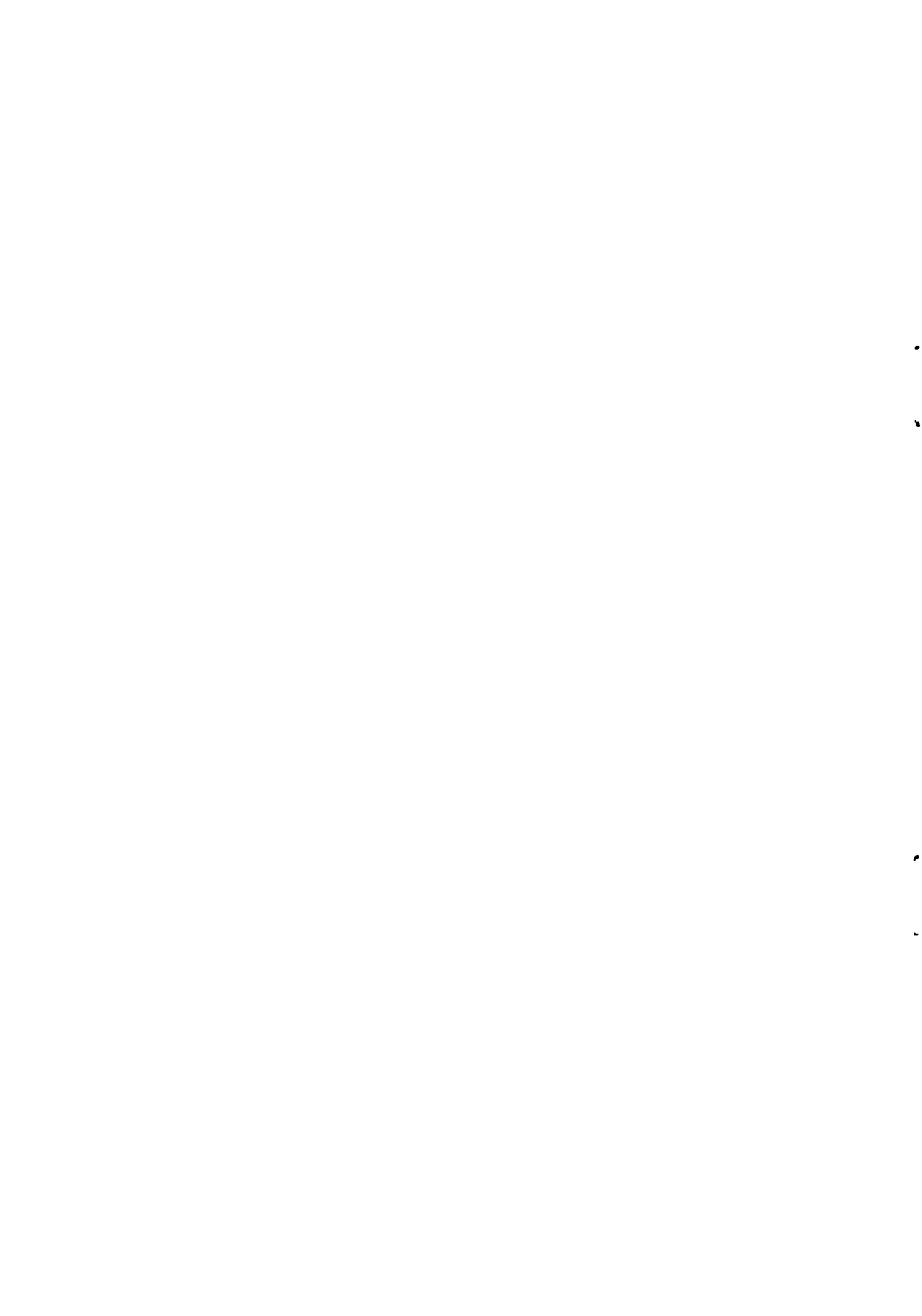
1. На основании морфологического и цитохимического анализов у личинок стрекоз рода *Aeshna* были выделены три основных типа гемоцитов: прогемоциты (Pr), гранулоциты (Gr) и плазматоциты (Pl).
2. В гемолимфе личинок стрекоз рода *Aeshna* была выявлена агглютинирующая активность. Молекулярный вес нативного агглютинина составил 380 - 390 kDa. Молекула агглютинина состоит из 4-х субъединиц весом 90 kDa. Агглютинины экспрессировались в плазматоцитах и гранулоцитах.
3. В гемоцитах стрекоз были обнаружены бактерии рода *Pseudomonas*. Наличие эндобионтов в клетках крови не влияло на протекание иммунных реакций в личинках стрекоз рода *Aeshna*.
4. Впервые на территории России у личинок стрекоз, в частности – *A. viridis* обнаружили микроспоридии (*Systemostrema alba*).
5. Зарегистрировали заражение личинок стрекоз рода *Aeshna* личинками трематод семейств *Plagiorhidae* и *Prosthogonimidae*. Цисты трематод не инкапсулируются гемоцитами и не блокируют инкапсуляцию чужеродных веществ в гемоцелле личинок стрекоз. При пересадке цист трематод семейств *Plagiorhidae* и *Prosthogonimidae*, полученных из различных видов стрекоз в личинок рода *Aeshna*, было выяснено, что поверхностный слой паразитов не распознается иммунной системой хозяина.
6. При инъекции бактериальной суспензии в гемоцель личинкам, зараженным трематодами, обнаружено отсутствие влияния цист трематод на клеточные иммунные реакции, в частности механизмы грануло- и капсулообразования.
7. Использование цитохимических маркеров позволило выявить, что у зараженных трематодами личинок стрекоз количество иммунокомпетентных клеток (ФО- и НСТ-положительных), вдвое меньше по сравнению с не зараженными личинками характеризующихся высоким уровнем генерации АКМ и фенолоксидазной активностью.

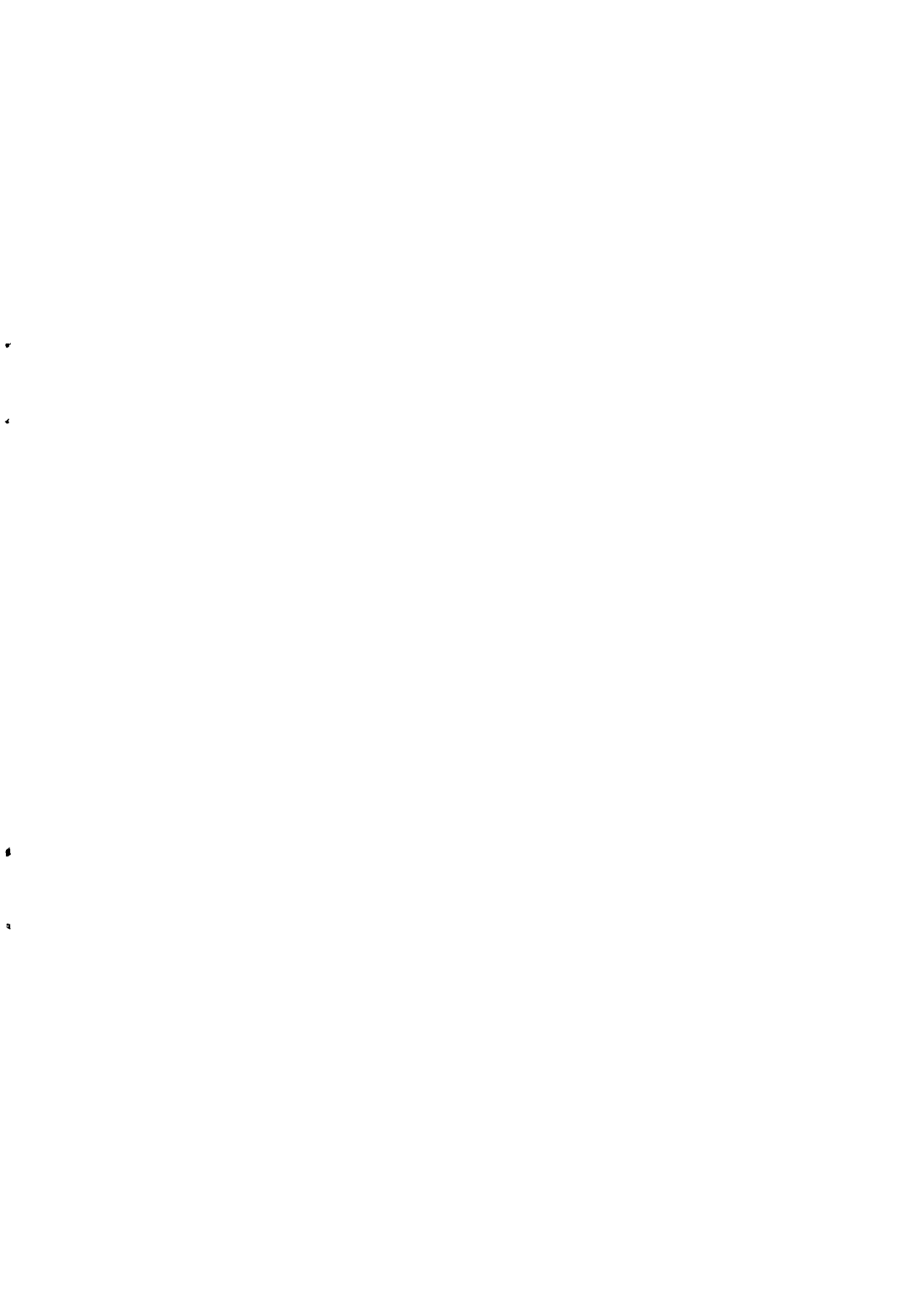
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

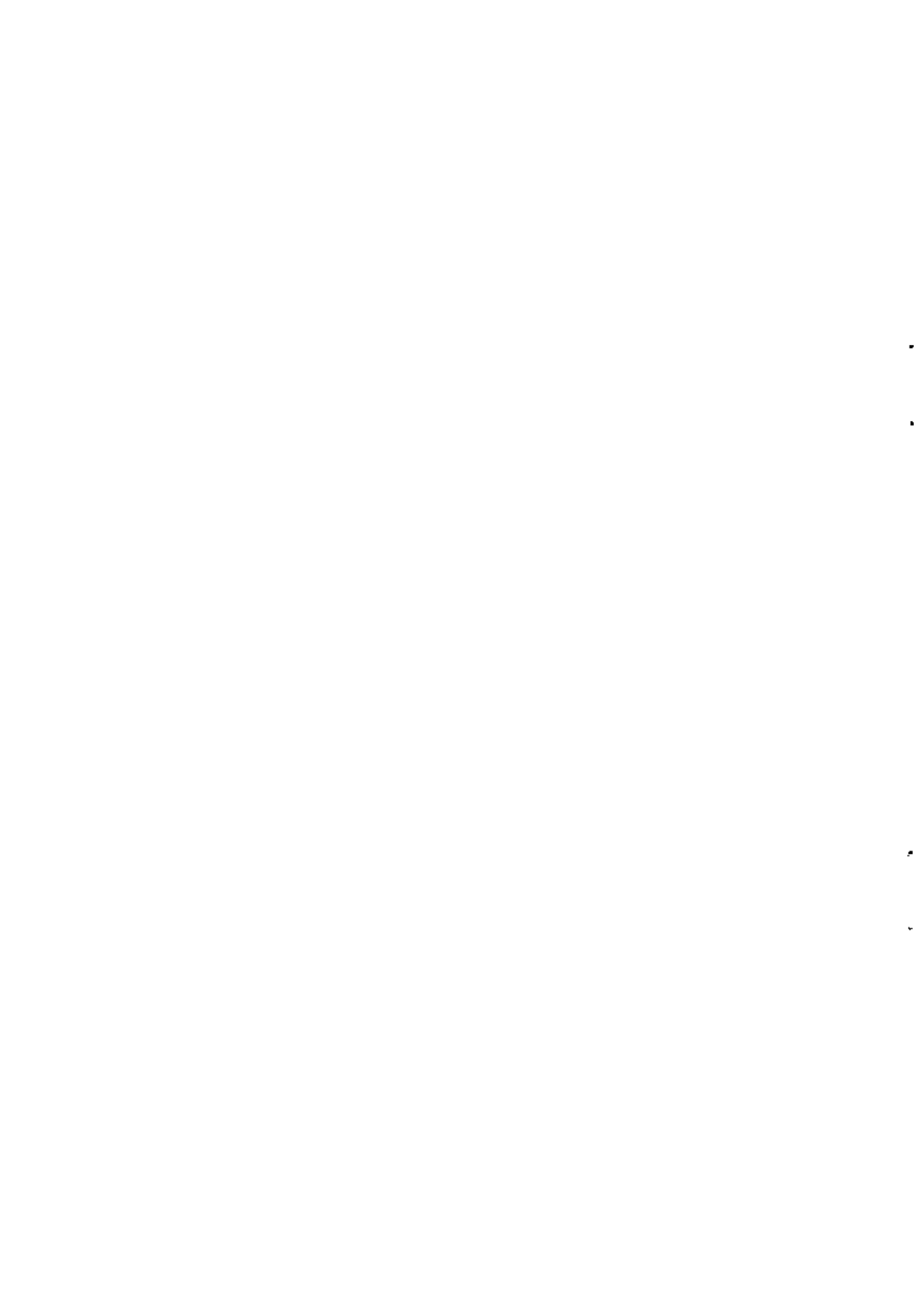
Крюкова Н.А., Глулов В.В. Изучение гемоцитов с помощью хлортетрациклина // Регуляция численности беспозвоночных и фитопатогенов (под ред. Штерншиш М.В., Глулова В.В.), Новосибирск, 1997,- С. 38-41.

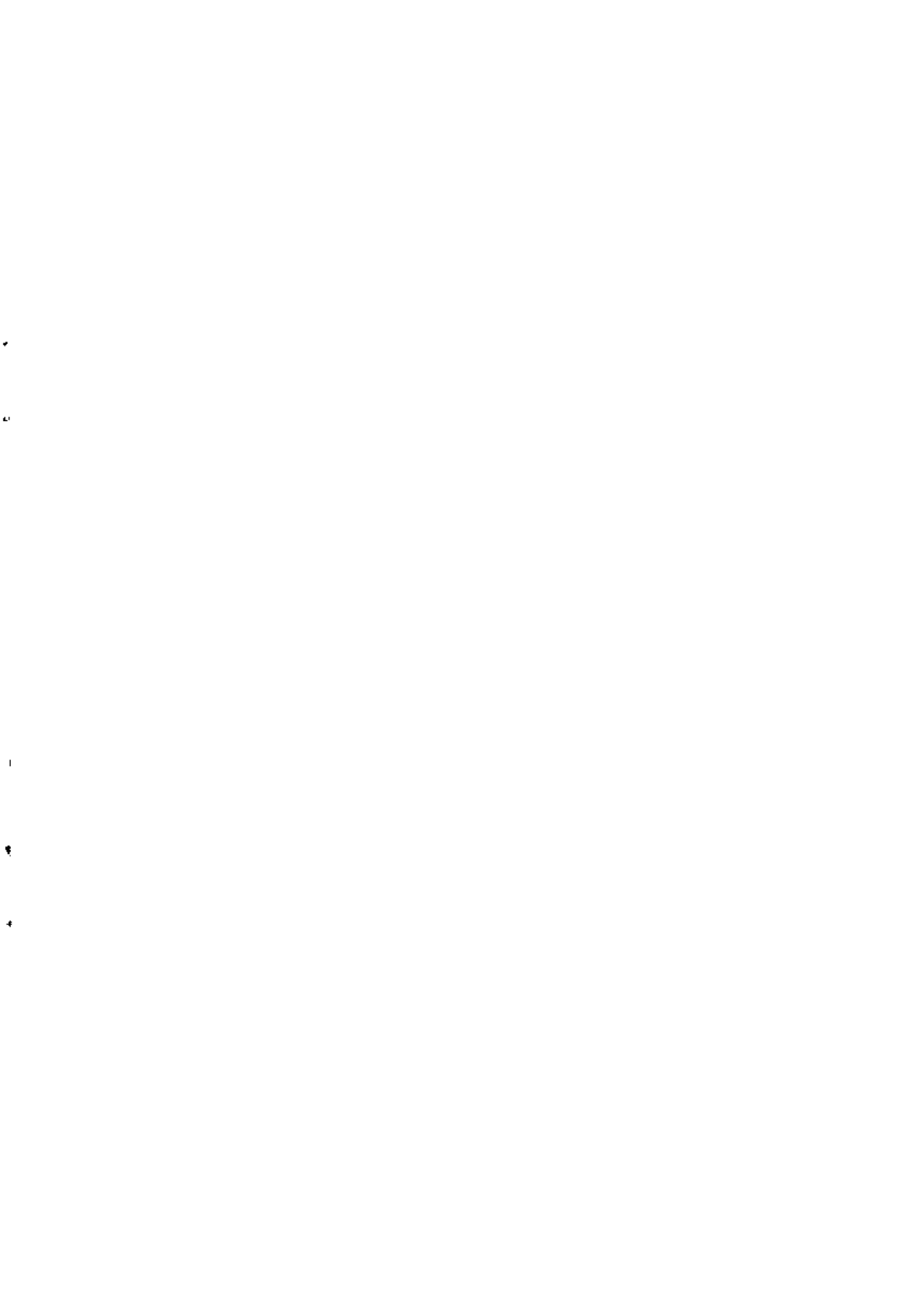
Глулов В.В., Хвощевская М.Ф., Крюкова Н.А., Лозинская Я.Л., Дубовских И.М., Мертемянов В.В., Формирование клеточного иммунитета насекомых (*Insecta*): образование активированных кислородных метаболитов в гемоцитах // Беспозвоночные животные

- Южного Зауралья и сопредельных территорий. Матер. Всерос. Конф. 14-16 апр. 1998. Курган -1998г.- С. 93-95.
- Сухачева Г.А., Крюкова Н.А., Сербина Е.И. Влияние трематод на биохимические параметры популяции личинок стрекоз р. *Aeschna* // Всероссийская научная конференция "Взаимоотношения паразита и хозяина" Тезисы докладов. Москва 1998.
- Глулов В.В., Крюкова Н.А., Ходырев В.П., Соколова Ю.Я. Эндоситобонты гемоцитов личинок стрекоз *Aeschna juncia* L. (Odonata) / Endocytobionts of haemocytes of *Aeschna juncia* L. dragonfly (Odonata) // Евроазиатский Энтомологический журнал, 2002.- С. 131-132.
- Сухачева Г.А., Крюкова Н.А., Глулов В.В. О роли морфометрических и биохимических критериев при идентификации видов (на примере личинок стрекоз рода *Aeshna*) // Известия АН, сер. биол. 2003.- № 1.- С.74-80.
- Крюкова Н.А., Соколова Ю.Я., Глулов В.В. Микроспориديоз личинок стрекоз *Aeshna viridis* (Odonata, Aeshnidae), вызываемый *Systemostrema alba* Larsson 1988 (Microsporidia, Telohaniidae) // Паразитология (в печати).
- Крюкова Н.А., Глулов В.В., Юрлова Н.И., Влияние трематод на клеточный иммунитет стрекоз *Aeshna grandis* и *Aeshna viridis* (Odonata) // Паразитология 2005. – Т. 34.- вып. 4.- С. 306-317.
- Sokolova Y., Krukova N., Glupov V., Fuxa J. *Systemostrema alba* Larsson 1988 (Microsporidia, Telohaniidae) in Dragonflies, *Aeschna viridis* (Odonata, Aeshnidae), from South Siberia: Morphology and Molecular Characterization // J. Eukariot. Microbiol. 2006 Vol. 53. (в печати).









05 - 22411

РНБ Русский фонд

2006-4

22651

897