

УДК 594.3 : 572.17+ 576.895.122

ЗАЩИТНЫЕ РЕАКЦИИ БРЮХОНОГИХ МОЛЛЮСКОВ. ГУМОРАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ

© Г. Л. Атаев, Е. Е. Еремина, А. В. Полевщиков

Среди многих вопросов, связанных с защитными реакциями гастропод, наибольшее значение современные исследователи уделяют именно гуморальным аспектам. Тем не менее известны лишь единичные публикации, в которых обобщены результаты многочисленных работ, выполненных в этом направлении. Проведение подобного анализа затруднено прежде всего противоречивостью и фрагментарностью экспериментальных данных, полученных на разных моделях, с применением различных методов. Кроме того, гуморальные реакции часто тесно связаны с клеточными, что также усложняет их изучение. Эти обстоятельства и обусловили отдельное рассмотрение клеточных и гуморальных механизмов ответных реакций гастропод на чужеродные объекты. Клеточные реакции моллюсков были проанализированы в нашей предыдущей статье (Атаев, Полевщиков, 2004), поэтому в данной работе будут обобщены основные данные о гуморальных реакциях. Важно отметить, что в качестве функциональных аналогов иммуноглобулинов позвоночных животных у моллюсков, как и у других беспозвоночных, нами признаются лектины.

Классическая иммунология определяет иммунитет как систему специфических молекулярных и клеточных взаимодействий, основанных на наличии молекул иммуноглобулинового суперсемейства, которые направлены на поддержание антигенного гомеостаза организма и связаны с формированием иммунологической памяти. Несмотря на многолетний интерес к проблемам сравнительной иммунологии, изначально вызванный еще работами И. И. Мечникова (Мечников, 1947), системное изучение защитных реакций беспозвоночных, в том числе моллюсков, началось в последние 25 лет. Поэтому термин «иммунитет», традиционно используемый для обозначения защитных реакций позвоночных животных, до настоящего времени применяется по отношению к беспозвоночным с определенными оговорками. Долгое время считалось, что защитные реакции беспозвоночных носят антиген-неспецифический характер, т. е. чужеродные факторы приводят к запуску всех защитных механизмов, а параметры ответа на разные антигены реально не различаются. Однако данные последних лет указывают на наличие у беспозвоночных сложных многокомпонентных защитных систем и способности к распознаванию широкого круга чужеродных молекул. Поэтому, несмотря на отсутствие распознающих молекул иммуноглобулинового суперсемейства, защитные реакции беспозвоночных все чаще признаются иммунными. Тем не менее, используя термины «иммунитет», «антиген», «иммунизация», «иммунный ответ» и многие другие, следует учитывать, что

исходно они сформировались для определения реакций приобретенного иммунитета позвоночных животных и в рамках сравнительно-иммунологических работ носят достаточно условный характер. Сказанное в полной мере относится и к настоящей публикации.

Различают 2 главных механизма иммунных реакций: клеточный и гуморальный. В литературе активно обсуждается роль клеточных и гуморальных компонентов гемолимфы моллюсков в защитных реакциях, природа резистентности и чувствительности этих животных. Появляется все больше новых данных, раскрывающих значение гуморальных реакций на всех этапах иммунного ответа брюхоногих легочных моллюсков (Pulmonata). Выявляются механизмы распознавания «своего—чужого», инициации гуморального и клеточного ответов, пути гуморального подавления паразитов и патогенов.

В нашей предыдущей статье мы проанализировали клеточные реакции гастропод (Атаев, Полевщиков, 2004). Гуморальным реакциям беспозвоночных также посвящен ряд обзоров и монографий (Cooper, 1976; Купер, 1980; Галактионов, 1995; Полевщиков, 1996), но приводимые в них материалы либо требуют ревизии в свете новых данных, либо практически не затрагивают гуморальные реакции брюхоногих моллюсков. В то же время обзору последних посвящены специальные работы, основанные исключительно на результатах изучения гуморальных реакций гастропод в ответ на заражение трематодами (Lodes, Yoshino, 1994; Adema et al., 2000). Именно отсутствие комплексного анализа гуморальных аспектов защитных реакций моллюсков и предопределило тему данной работы.

Эволюционно гуморальные реакции являются вторичными по отношению к клеточным, так как их появление подразумевает наличие сформированной внутренней среды (Заварзин, 1953). Это проявляется в обоих эволюционных стволах (у первично- и вторичноротых животных). Становление гуморальных реакций, как правило, предусматривает наличие циркуляторных систем и связанных с ними клеточных элементов, вовлеченных в защитные реакции, а также существование кооперативных взаимодействий между циркулирующими клетками и клетками других органов. Даже среди хордовых, обладающих молекулами иммуноглобулинового суперсемейства, возникновение гуморальных реакций завершается только у хрящевых и костистых рыб, в то время как клеточные реакции, основанные на наличии таких молекул, выявлены уже у асцидий (Фонталин, 1988). В свою очередь анализ гуморальных реакций первичноротых, в том числе и моллюсков, существенно затруднен, так как остается неясным, секрета каких молекул вызывается защитными реакциями. С этим связана высокая актуальность изучения специфичности гуморальных реакций беспозвоночных в целом.

В классической иммунологии под специфичностью любых реакций (в том числе и гуморальных) понимают высочайшую степень соответствия структуры антиген-связывающего сайта распознающей молекулы и антигена. Не случайно расчетное число специфичностей иммуноглобулиновых молекул млекопитающих достигает астрономической величины — 10^{18} различных молекул. Однако в ходе гуморального ответа на конкретный антиген повышаются концентрации молекул всего нескольких десятков или сотен специфичностей. Более того, из всех секретируемых иммуноглобулинов только малая часть обладает высоким сродством к антигену, оцениваемым в 10^{-8} — 10^{-11} M, что и определяет специфичность ответа. В то же время большинство участвующих в ответе иммуноглобулинов имеет гораздо более

низкую степень сродства к распознаваемым антигенам, оцениваемую в 10^{-4} — 10^{-7} М. С этой точки зрения ответ беспозвоночных на первый взгляд действительно представляется неспецифическим, ибо они способны распознавать всего несколько десятков или сотен чужеродных структур. Однако при сравнении степени специфичности этих распознающих молекул беспозвоночных к их лигандам выясняется, что константы диссоциации комплексов очень низки и равны 10^{-8} — 10^{-12} М. Это соответствует самым высоким значениям для молекул иммуноглобулинового суперсемейства (Janeway et al., 2001). Данный феномен лишней раз подчеркивает сложность оценки специфичности гуморальных реакций беспозвоночных и относительность используемых для ее проведения критериев.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ГУМОРАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ГАСТРОПОД

В настоящее время в качестве функциональных аналогов иммуноглобулинов позвоночных животных у беспозвоночных, в том числе и моллюсков, признаются лектины (Полевщиков, 1996). К лектинам относятся белки или гликопротеины неиммунной природы, обладающие сайтами олигосахаридного связывания и способные агглютинировать или преципитировать гликоконъюгаты, локализованные на клеточных поверхностях (Лахтин, 1987). Их действие сходно с антителами позвоночных. Эта аналогия усиливается еще и тем, что связывание лектинов с лигандами приводит к облегчению процесса фагоцитоза (опсонизации) связываемой частицы, преципитации формирующегося комплекса, либо к лизису клетки, несущей лигандную группировку.

Все лектины делятся на 4 типа (Fraser, Ezekowitz, 1999).

1. Ca^{2+} -зависимые, все остатки цистеина которых образуют дисульфидные мостики, относятся к С-типу.

2. Ca^{2+} -независимые, имеющие в своем составе остатки цистеина и не образующие между собой —S—S-связей, объединяются в S-тип.

3. Лектины, содержащие домены иммуноглобулинового суперсемейства, относят к I-типу.

4. Лектины, связывающие манноза-6-фосфат, составляют Р-тип.

В гемолимфе моллюсков выявлен целый спектр углеводов-связывающих (лектиновых) веществ, участвующих в распознавании, связывании и нейтрализации многочисленных патогенов и паразитов, проникающих во внутреннюю среду (Купер, 1980; Glinski, Jarosz, 1997). Гемолимфа большинства моллюсков содержит несколько различных типов лектинов, каждый из которых реагирует с эритроцитами разных видов животных. Анализ спектра лигандных специфичностей показал, что наиболее распространенными лигандами являются N-ацетилированные сахара. Подавляющее большинство гемагглютининов проявляет свою биологическую активность в присутствии катионов кальция и магния (Галактионов, 1995). В ряде экспериментальных моделей основным объектом в исследованиях литической активности лектинов моллюсков выступают эритроциты млекопитающих, поэтому эту функциональную группу лектинов часто называют гемолизинами.

В условиях *in vitro* установлено, что циркулирующие макрофагоподобные амeboциты *Lymnaea stagnalis* обладают рецепторами для инородных молекул и клеток. Эти рецепторы являются лектиновыми молекулами, обратимо связанными с мембраной амeboцита (Van der Knaap et al., 1983). Под влия-

нием иммунизации бактериями уровни агглютинирующей и опсонизирующей активности гемолимфы моллюска неспецифически нарастают. Установлено также, что с возрастом концентрация лектинов в гемолимфе повышается (Полевщиков, 1996).

Виноградная улитка *Helix pomatia* относится к наиболее изученным видам. В ее гемолимфе найден целый спектр агглютининов и опсонин, хотя неясно, являются агглютинины опсонинами или нет. Один из этих лектинов (НРА) нашел широкое применение в гистохимии, где он используется для выявления части клеток желез желудка, лимфоцитов небных миндалин и в других случаях (Ishiyama, Uhlenbruck, 1971; Axelsson et al., 1978; Луцик и др., 1981). В 1982 г. Бейн показал, что основным местом продукции агглютининов является пищеварительная железа («печень») моллюска (Wayne, 1982). В ответ на введение *Pseudomonas aeruginosa* титр агглютининов в гемолимфе повышается неспецифическим образом.

В целом для гастропод отмечена тенденция к переходу от синтеза лектинов клетками гемолимфы к их синтезу другими органами и тканями: белковой железой, гепатопанкреасом, гонадой (Полевщиков, 1996). Например, из экстракта белковой железы моллюска *Pila globosa* выделен лектин, специфичный к N-гликонеураминной кислоте, который агглютинирует эритроциты кролика в присутствии ионов кальция и обладает уникальной лигандной специфичностью к N-гликонеураминной кислоте (Swarnakar et al., 1991).

Гемолимфа *Biomphalaria glabrata* содержит целый спектр агглютининов и опсонин, концентрация которых увеличивается с возрастом. Установлено, что лектины этого моллюска являются агглютининами в отношении спороцист *Schistosoma mansoni* и более того оказывают на них цитотоксическое воздействие (Wayne et al., 1985). Для этого вида выявлено 2 гена, кодирующих лектины адгезии: интегрин-подобный ген (Davids, Yoshino, 1998; Davids et al., 1999) и селектин-подобный ген (Duclermortier et al., 1999).

Одним из свойств агглютининов гемолимфы является их способность выступать в качестве опсонизирующих факторов через процесс взаимодействия с углеводными компонентами корпускулярных антигенов (Галактионов, 1995). Выделяют несколько основных моделей опсонизации (Van der Кнаар, Loker, 1990): 1 — лектин, ассоциированный с мембраной гемоцита, связывает углеводный эпитоп на поверхности фагоцитируемой клетки; 2 — лектин гемолимфы одним сайтом связывает лиганд на поверхности паразита, а другим — углеводный лиганд на поверхности гемоцита; 3 — лектин гемолимфы одним сайтом связывает лиганд на поверхности паразита, а затем связывается со специфическим рецептором, ассоциированным с мембраной гемоцита; 4 — свободный лектин гемолимфы (не связанный с лигандом) не способен связываться с рецептором на поверхности гемоцита, но обретает такую способность после связывания с ним в результате конформации молекулы или ее ограниченного протеолиза.

Для всех моделей (кроме первой) в процессе связывания и опсонизации помимо углеводов возможно участие и белковых лигандов.

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ

Данные об антимикробных белках и пептидах, секретируемых гемоцитами моллюсков в ходе защитных реакций, приведены нами в обзоре, посвященном клеточным защитным реакциям (Атаев, Полевщиков, 2004).

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ КАСКАДЫ

Роль ферментативных каскадов наиболее наглядно проявляется на примере процесса инкапсуляции трансплантатов (Jourdane, Cheng, 1987). Ферменты (предположительно лизосомальные гидролазы), выделяемые гранулоцитами, изменяют поверхность трансплантата и инициируют синтез фиброзных волокон. При этом важно отметить, что как ферменты, так и материал для фибриллогенеза образуются в результате процессов специализации (и/или деструкции) гемоцитов. Это явление подтверждает тесную связь клеточных и гуморальных защитных реакций. Сходные данные получены в процессе изучения инкапсуляции партенит трематод различных видов (Lie, Heyneman, 1975 a, b; Loker et al., 1986; Sullivan, Hu, 1996).

ПРОЯВЛЕНИЕ ГУМОРАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ ГАСТРОПОД ПРИ ЗАРАЖЕНИИ ТРЕМАТОДАМИ

Многолетние исследования защитных реакций гастропод на заражение трематодами показали, что клеточные реакции моллюсков играют ведущую роль в подавлении инвазии (Lie et al., 1975; Lie, Heyneman, 1975 a, b, 1976 a, b; Jourdane, Cheng, 1987; Ataev, Coustau, 1999; Adema et al., 2000; Ataev et al., 2000; Connors, 2003, и др.). В то же время, как уже отмечалось, все многообразие и сложность взаимодействий брюхоногих моллюсков и паразитов не сводится только к гемоцитарным реакциям. В литературе существуют различные точки зрения относительно значения гуморального иммунитета в клиренсе внутренней среды моллюсков от чужеродных объектов, а также о путях и формах взаимодействия клеточных и гуморальных реакций.

Роль гуморальных реакций гастропод в подавлении заражения трематодами хорошо иллюстрируется экспериментами с повторным заражением *Biomphalaria glabrata* мирацидиями трематод *Echinostoma lindoense*, *E. caproni*, *Schistosoma mansoni*, при котором происходит ускоренное развитие ответной реакции по сравнению с первичным заражением (Lie, Heyneman, 1976 a, b; Sullivan, Hu, 1996; Ataev, Coustau, 1999). После вторичной инвазии большинство спороцист не достигает места окончательного поселения (желудочка сердца). Соответственно партениты вынуждены развиваться в субэпителиальных или соединительных тканях моллюска, что приводит к гибели паразитов в отсутствие инкапсуляции (Lie, Heyneman, 1976 b; Ataev et al., 1997). Столь раннее блокирование развития партенит, очевидно, вызвано атипичной локализацией, а не защитными реакциями. Роль последних в этом случае сводится как раз к нарушению процесса миграции, в чем гуморальные факторы могут играть не последнюю роль.

Интересно отметить, что предварительное заражение мирацидиями одного вида может увеличивать резистентность к трематод других видов (Lie, Heyneman, 1976 a). Это явление получило название «личиночного антагонизма» (Sullivan, Hu, 1996; Sire et al., 1998). При последовательном заражении *Biomphalaria glabrata* сначала *Schistosoma mansoni*, а затем *Cotylurus lutzii* двойного заражения не происходит в том случае, если партениты шистозом развивались в моллюске 15 или более дней (Bash et al., 1969). Предполагается, что личиночный антагонизм включает в себя непосредственное взаимодействие паразитов (Mouahid, Mone, 1990; Атаев, Добровольский, 1992; Combes, 1995) и опосредованное — через защитные системы хозяина (Sire

et al., 1998). Данный механизм обеспечивает регуляцию численности популяции паразитов, что особенно существенно при интенсивной инвазии и множественном заражении.

В то же время предварительное заражение моллюсков трематодами одного вида может и понижать их резистентность в отношении паразитов других видов. Так, установлено, что заражение моллюска *Biomphalaria glabrata* спороцистами *Echinostoma paraensei* снижает изначальную резистентность некоторых линий моллюсков к другим трематодам, например к *Schistosoma mansoni* (Lie et al., 1975; Bayne, Yoshino, 1989). Гемоциты зараженных эхиностомами моллюсков теряют способность оседать на чужеродных объектах и аккумулироваться в определенных участках моллюска (Lie, Neupeman, 1976 b). Эти данные подтверждаются и экспериментами *in vitro*: для гемоцитов *Biomphalaria glabrata*, резистентных к *Schistosoma mansoni*, показано уменьшение способности атаковать шистозомные спороцисты в случае предварительного заражения моллюсков трематодами *Echinostoma paraensei* (Loker et al., 1986).

Другим доказательством значимости гуморальных реакций является сам процесс распознавания сосальщиков с участием молекул гемолимфы (Adema et al., 2000). Показано, что результатом этого взаимодействия может быть изменение лектинов — открытие на их молекулах сайтов связывания с клеточными рецепторами, с одной стороны, и с ферментами литических систем — с другой. Тем самым приобретает способность к связыванию гуморальных факторов с новыми лигандами, что определяет ход клеточных и гуморальных реакций (Connors, 2003).

Именно гуморальные факторы и, возможно, продукты их ограниченного протеолиза регулируют миграцию и концентрацию гемоцитов в определенных тканях хозяина, что указывает на их роль как хематтрактантов для циркулирующих клеток (Jourdane, Cheng, 1987). Кроме того, молекулы гемолимфы влияют не только на процессы адгезии гемоцитов и опсонизации чужеродных объектов, что существенно для протекания клеточных реакций, но и обладают агглютинирующей и литической активностями — важнейшими формами проявления гуморальных реакций (Sullivan, Spence, 1999; Connors, 2003).

Гуморальные факторы также играют значимую роль в регуляции и реализации цитотоксической активности гемоцитов (Van der Knaap, Loker, 1990). Спороцисты *Schistosoma mansoni* агглютинируются только в плазме резистентных моллюсков *Biomphalaria glabrata* (Bayne, Yoshino, 1989). Помимо этого, факторы гемолимфы резистентных особей вызывают инкапсуляцию и гибель спороцист (Connors, Yoshino, 1990). Эти свойства могут быть переданы чувствительным моллюскам при введении им плазмы гемолимфы от резистентных особей (Granath et al., 1984; Connors, Yoshino, 1990; Van der Knaap, Loker, 1990).

На первой стадии инкапсуляции, в ходе концентрации гемоцитов вокруг партенит, цитотоксическая активность клеток хозяина заметно повышается после обработки С-лектинами гемолимфы, либо растительным лектином конканавалином А (из бобового растения *Canavalia ensiformis*) (Boswell, Bayne, 1987 — цит. по: Van der Knaap, Loker, 1990). Кроме того, смертность спороцист *in vitro* всегда выше в присутствии гемолимфы. При повторном заражении моллюсков бразильской линии *Biomphalaria glabrata* мирацидиями *Schistosoma mansoni* на третий день после первой инвазии только у 11.8 % моллюсков обнаруживалась вторая материнская спороциста (что свидетельствовало об успешности вторичной инвазии), через одну неделю — у 88.4,

а через 2 недели — только у 55.4 % моллюсков. При увеличении интервала между заражениями до 3.5 и 8 недель в моллюсках обнаруживались только спороцисты от первичной инвазии. Интенсивность заражения связывают с продолжительностью реализации жизненного цикла трематод: материнские спороцисты *S. mansoni* в среднем живут около 7—10 недель (Sier et al., 1998).

Такой механизм цитотоксичности гемолимфы для паразитов можно рассматривать как аналог реакции антитело-зависимой клеточной цитотоксичности, которая у всех позвоночных является одним из главных механизмов устойчивости в отношении клеток инфицированных вирусами и паразитическими простейшими. Если этот механизм реально существует, то цитотоксические молекулы гемолимфы моллюсков (лектины?) полностью дублируют функцию антител позвоночных, «наводя» на чужеродные клетки удар со стороны гемоцитов. Однако реальность этого феномена требует дополнительной экспериментальной проверки, поскольку некоторые авторы высказывают опасение, что токсичность гемолимфы является артефактом, связанным с окислением ее компонентов в условиях *in vitro* (R. C. Bender, неопубликованные данные — цит. по: Hahn, Bender, Bayne, 2001).

Сам процесс инкапсуляции в этом случае можно рассматривать как механизм иммобилизации паразита и его изоляции от внутренней среды хозяина. Соответственно гибель паразита является следствием воздействия именно гуморальных факторов (Lie, Heuneman, 1976 b; Connors et al., 2003). Тем не менее на заключительных этапах инкапсуляции — после гибели паразита под влиянием цитотоксических факторов гемолимфы — ведущая роль в утилизации его клеточного материала принадлежит уже фагоцитирующим клеткам капсулы.

Одним из доводов в пользу этой точки зрения является сохранение просвета между стенкой капсулы и поверхностью паразита (практически до его гибели), где могут накапливаться цитотоксические факторы (Ataev, Coustau, 1999). В качестве последних могут выступать не только лектины, обладающие литической активностью, но и ферментативные, например пероксидазные каскады (Connors et al., 1991). Если сравнивать структуру капсул гастропод и млекопитающих (например, при инфицировании туберкулезными микобактериями), то в капсулах последних, помимо цитотоксических факторов, накапливаются также хематтрактанты и медиаторы иммунитета, вызывающие привлечение и активацию циркулирующих клеток. Не исключено, что аналогичное явление имеет место и у гастропод, но это предположение требует экспериментальной проверки. Наконец, имеются данные, полученные *in vivo*, согласно которым роль гуморальных факторов в процессе гибели партенит трематод является основной. Так, дегенерация материнских спороцист *Echinostoma lindoense* в моллюсках *Biomphalaria glabrata* вообще может протекать без предварительной инкапсуляции (Lie, Heuneman, 1976 a).

Отдельного обсуждения заслуживают результаты экспериментов, выполненных с использованием так называемых «экскреторно-секреторных продуктов» (ЭСП), которые выделяются партенитами в ходе трансформации мирацидия в материнскую спороцисту и ее последующего развития. Установлено, что ЭСП оказывают значительно большее влияние на иммунный ответ моллюсков, чем продукты, выделяемые уже завершившим метаморфоз паразитом. С этим связано различие экспериментальных данных, полученных *in vivo* и *in vitro*, так как в последнем случае ЭСП отличаются качественно и накапливаются в меньших концентрациях (Connors, Yoshino,

1990). Показано, что ЭСП влияют на белковый синтез в гемоцитах, их цитотоксическую и фагоцитарную активности (Connors, Yoshino, 1990; Loker et al., 1992; Humbert, Costau, 2001). Так, в исследованиях *in vitro* показано, что исходный уровень синтеза полипептидов гемоцитами резистентных *Biomphalaria glabrata* выше, чем у клеток моллюсков восприимчивой линии (Bayne, Yoshino, 1989).

Установлено, что ЭСП стимулируют гемоциты чувствительной линии биомфаларий к секреции полипептидов с молекулярной массой 63 и 66 кДа. Резистентные гемоциты усиливают секрецию 63 кДа-компонентов и ускоряют синтез 66 кДа-полипептидов, однако не стимулируют секрецию последних. При этом ЭСП не оказывают подобного влияния на эмбриональные клетки *Biomphalaria glabrata* (линия BGF-cells), что указывает на специфичность воздействия в отношении гемоцитов хозяина (гемоцитоспецифичность), основанную только на гуморальных взаимодействиях (Bayne, Yoshino, 1989; Connors, 2003). Важным эффектом ЭСП является их влияние на продукцию гемоцитами активных форм кислорода (Connors, Yoshino, 1990; Humbert, Costau, 2001), продукция которых постепенно снижается в процессе трансформации мирацидия (Lodes, Yoshino, 1989). Это указывает на важную роль кислородных метаболитов в периоды пенетрации и трансформации материнской спороцисты, а также на неэффективность данного защитного механизма хозяина в отношении взрослых партенит (Looker, Bayne, 1992).

ЭСП спороцист также влияют на способность гемоцитов хозяина к хемотаксису (Bayne, Yoshino, 1989). Эти данные были получены в ходе проведения серий экспериментов с использованием камеры Бойдена, представляющей собой две ячейки, разделенные горизонтально полупроницаемой для клеток мембраной (с определенным размером пор, через которые возможно только активное продвижение гемоцитов). При оценке миграционной активности гемоцитов установлено, что высокомолекулярные (более 30 кДа) ЭСП достоверно угнетают направленное к паразиту движение клеток только чувствительных линий, в то время как низкомолекулярные (до 10 кДа) ЭСП подавляют миграцию гемоцитов как чувствительных, так и резистентных линий моллюсков (Bayne, Yoshino, 1989; Humbert, Costau, 2001).

Характер влияния ЭСП зависит как от их концентрации, так и от генетически детерминированной резистентности моллюска. Уже сама прединкубация гемоцитов резистентных моллюсков в среде, содержащей ЭСП *in vitro*, ведет к активации клеток, что выражается в их распластывании и формировании ламеллоподий (Loker et al., 1992). Очевидно, именно с этим явлением связано то, что эффективность заражения мирацидиями *Echinostoma paraensei* моллюсков *Biomphalaria glabrata* прямо коррелирует с дозозависимой способностью ЭСП паразита ингибировать распластывание и адгезивные свойства гемоцитов хозяина *in vitro* (DeGaffe, Loker, 1998). В этой связи неудивительно, что ЭСП по-разному влияют на фагоцитарную способность гемоцитов, реализуемую на уровне клетки как раз через ламеллоподии: если чувствительные линии сокращают фагоцитарную активность в отношении дрожжевых клеток *in vitro* после их обработки ЭСП, то резистентная линия, напротив, повышает ее (Connors, Yoshino, 1990; Humbert, Costau, 2001).

Отдельного обсуждения заслуживают состав и структура ЭСП. С использованием методов электрофореза (на SDS-PAGE) и автордиографии показано, что ЭСП по молекулярной массе могут быть разделены на несколько групп. На примере материнских спороцист *Echinostoma paraensei* установле-

но наличие ЭСП с массами 14—20, 30—50, 66—70, 80, 108 и 200 кДа (Loker et al., 1992; Lodes, Yoshino, 1994). Некоторые из фракций представлены термостабильными факторами (66 кДа), в то время как остальные — термолabileными (Wayne, Yoshino, 1989). Кроме того, для отдельных ЭСП установлена молекулярная структура. В частности, ЭСП с массой 108 кДа является гликопротеидом, состоящим из 2 или 3 субъединиц (молекулярной массой от 46 до 50 кДа). Уже выделено 2 изомера этого продукта. Изомер с положительным зарядом вызывает уменьшение продукции активных форм кислорода гемоцитами, но не влияет на фагоцитоз частиц зимозана. Отрицательно заряженный изомер также уменьшает продукцию кислородных радикалов, но при этом он уменьшает и интенсивность фагоцитоза. Различия в свойствах этих изомеров могут быть обусловлены разным сочетанием субъединиц в молекуле (Loker et al., 1992).

СТРАТЕГИЯ ИЗБЕГАНИЯ ТРЕМАТОДАМИ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ ГАСТРОПОД

Если начальное взаимодействие между гемоцитами и паразитом основано на физико-химических свойствах (наличие заряда и гидрофобность клеточных поверхностей), то последующее прецизионное распознавание «свое» — «чужое» базируется на лиганд-рецепторных взаимодействиях (Van der Knapp, Loker, 1990). Трематоды различаются по способности к взаимодействию с внутренними защитными системами моллюска и соответственно по его механизмам, которые предполагают различное соотношение гуморальных и клеточных реакций в подавлении трематодной инвазии (Connors, 2003). Так, считается, что *Schistosoma mansoni* имеет изначально меньшую способность к взаимодействию с внутренней защитной системой моллюска, чем другие трематоды, в частности эхиностомы (Sire et al., 1998).

В условиях постоянного взаимодействия с чужеродными антигенами резистентность к паразиту является, скорее, правилом, а восприимчивость — исключением. Поэтому успешность заражения зависит прежде всего от способности паразита «избегать» или подавлять защитные реакции хозяина. Ключевая роль распознавания чужеродного для дальнейшего развития иммунного ответа предопределяет основную стратегию защиты: предотвращение распознавания — наиболее эффективный способ выживания паразита внутри моллюска (Wayne, Yoshino, 1989).

В настоящее время в паразитологической литературе предлагаются 3 основные гипотезы, объясняющие механизмы избегания партенитами трематод защитных реакций моллюсков. Первая гипотеза — молекулярной мимикрии — подразумевает экспрессию паразитом поверхностных молекул, опознаваемых внутренними защитными системами хозяина как «свое». В качестве примера действенности такого механизма приводится паразито-хозяинная система *Schistosoma japonicum*—*Oncomelania hupensis* (Iwanaga, Tsuji, 1985; Wayne, Yoshino, 1989). С использованием метода иммуноэлектрофореза показано, что разные уровни восприимчивости хозяина коррелируют с различным содержанием (концентрацией) поверхностных антигенов паразита. Известно, что антитела позвоночных животных не реагируют на антиген полностью, а только на определенный его участок — антигенную детерминанту или эпитоп. Таким образом, не обязательно все, а только один или несколько антигенов с несколькими эпитопами могут быть вовлечены в совместимое взаимодействие *Schistosoma japonicum* и *Oncomelania hupensis* (Wayne, Yoshino, 1989). К тому же у паразита могут

иметься уникальные эпитопы, к которым у хозяина нет антигенов. И здесь паразит использует отсутствие специфических распознающих молекул (Van der Кнаар, Loker, 1990).

Согласно второй гипотезе — молекулярной маскировки — выживание паразита обеспечивается осаждением на его поверхности молекул гемолимфы хозяина. В основе этого явления могут лежать как пассивная сорбция молекул гемолимфы, так и их активный захват посредством специальных рецепторов на поверхности паразита (Van der Кнаар, Loker, 1990). Использование обоих механизмов партенитами показано с использованием поликлональных и моноклональных антител и лектиногистохимии. В покровах партенит и в тканях моллюска обнаружены сходные углеводородные эпитопы (Van der Кнаар, Loker, 1990).

Согласно третьей гипотезе, выживаемость паразита основана на ингибировании процессов опсонизации и фагоцитоза. Исследователи полагают, что наличие в гемолимфе опсоинов является одним из факторов резистентности (Ваупе, Yoshino, 1989).

Однако, выполненный в рамках настоящего и предыдущего (Атаев, Полевщиков, 2004) обзоров анализ литературных данных в соответствии с современными концепциями общей иммунологии, позволяет предположить существование и других путей реализации стратегии выживания партенит трематод.

В этой связи большой интерес представляют результаты исследований, указывающих на большую роль экскреторно-секреторных продуктов в выживании партенит. Помимо устоявшейся точки зрения, согласно которой ЭСП — результат смены поверхностных антигенов паразита (реализация первой из описанных выше гипотез молекулярной мимикрии), можно предположить существование еще, по меньшей мере, трех механизмов устойчивости паразитов.

Во-первых, ЭСП могут выступать в роли «ложных мишеней», связывающих клеточные рецепторы и гуморальные факторы, потенциально опасные для партенит. Различные физико-химические свойства ЭСП, их активный синтез и высокие концентрации в гемолимфе моллюска указывают на их потенциальную способность блокировать рецепторы гемоцитов, либо нейтрализовать гуморальные факторы. Принимая во внимание индуцибельный характер динамики клеточных реакций, связанных с активизацией работы амебоцит-продуцирующего органа (Атаев, Coustau, 1999; Атаев et al., 2000), и соответственно быстрое истощение циркулирующих в гемолимфе гуморальных факторов, можно утверждать, что у паразита появляется существенный временной интервал, достаточный для завершения ранних, наиболее уязвимых этапов развития.

Во-вторых, ЭСП, которые часто обнаруживаются в циркуляции в виде комплексов с гуморальными факторами хозяина, можно рассматривать как следствие сбрасывания паразитом атакованных поверхностных участков. Эту стратегию широко применяют прокариотические патогены для защиты от литических каскадов хозяина.

Наконец, в-третьих, в качестве наиболее дискуссионной гипотезы, можно предположить, что ЭСП способны нарушать межклеточную кооперацию гемоцитов за счет связывания медиаторных молекул и ростовых факторов, что приводит к торможению пролиферативной активности амебоцит-продуцирующего органа. Иллюстрацией такой возможности могут служить данные, полученные при сравнительном анализе процессов инкапсуляции партенит в биомфалариях чувствительной и резистентной линий (Атаев, Coustau,

1999): у чувствительных моллюсков отмечалась задержка запуска клеточных реакций в ответ на заражение трематодами.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 04-04-49069) и грантом Министерства образования РФ (Е-00-6.0-181); стипендией Неправительственного фонда им. В. И. Вернадского, 2004 г.

Список литературы

- Атаев Г. Л., Добровольский А. А. Развитие микогемипопуляций редий *Philophthalmus thionica*, природно-зараженных другими видами трематод // *Паразитология*. 1992. Т. 26. С. 227–233.
- Атаев Г. Л., Полевщиков А. В. Защитные реакции брюхоногих моллюсков. 1. Клеточные реакции // *Паразитология*. 2004. Т. 38, вып. 4. С. 342–531.
- Галактионов В. Г. Очерки эволюционной иммунологии. М.: Наука, 1995. 256 с.
- Заварзин А. А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани. Избранные труды. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1953. Т. 4. 720 с.
- Купер Э. Сравнительная иммунология. М.: Мир, 1980. 422 с.
- Лахтин В. М. Лектины в исследовании белков и углеводов // *Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология*. М.: ВИНТИ, 1987. Т. 2. 288 с.
- Луцик М. Д., Панасюк Е. Н., Луцик А. Д. Лектины. Львів: Вища шк., 1981. 156 с.
- Мечников И. И. Лекции о сравнительной патологии воспаления. М.: Медгиз, 1947. 200 с.
- Полевщиков А. В. Лектины в защитных реакциях беспозвоночных // *Журн. общ. биол.* 1996. Т. 57, № 6. С. 718–739.
- Фонталин Л. Н. Проблема происхождения иммунной системы позвоночных животных // *Иммунология*. 1988. № 3. С. 5–20.
- Adema C. M., Sapp K. K., Hertel L. A., Loker E. S. Immunobiology of the relationships of the echinostomes with snail intermediate hosts // *Echinostomes as experimental models for biological research*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 2000. P. 149–173.
- Ataev G. L., Coustau C. Cellular response to *Echinostoma caproni* infection in *Biomphalaria glabrata* strains selected for susceptibility/resistance // *Dev. Comp. Immunol.* 1999. Vol. 23. P. 187–198.
- Ataev G. L., Dobrovolskij A. A., Avanesian A. V., Coustau C. Significance of the amoebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* snails (strain selected for susceptibility/resistance) in cellular response to *Echinostoma caproni* mother sporocyst infection // *Bull. Scand. Soc. Parasitol.* 2000. Vol. 2, N 10. P. 65.
- Ataev G. L., Dobrovolskij A. A., Fournier A., Jourddane J. Migration and development of mother sporocysts of *Echinostoma caproni* (Digenea: Echinostomatidae) // *Journ. Parasitol.* 1997. Vol. 83, N 3. P. 444–453.
- Axelsson B., Kimura A., Hammarstrom S., Wigzell H., Nilsson K., Mellstadt H. Helix pomatia A hemagglutinin: selectivity of binding to lymphocyte surface glycoproteins on T-cells and certain B-cells // *Eur. Journ. Immunol.* 1978. Vol. 8, N 11. P. 757–764.
- Bash P. F., Lie K. J., Heyneman D. Antagonistinteraction between strigeid and shistosome sporocysts within a snail host // *Journ. Parasitol.* 1969. Vol. 55. P. 753–758.
- Bayne C. J. Molluscan immunobiology: isolation of an *Aeromonas formicans* which escapes the internal defence system of *Helix pomatia* // *Dev. Comp. Immunol.* 1982. Vol. 6, N 4. P. 675–682.
- Bayne C. J., Yoshino T. P. Determinants of compatibility in mollusk-trematode parasitism // *Amer. Zool.* 1989. Vol. 29. P. 399–407.
- Combes C. Interactions durables. Ecologie et evolution du parasitisme. Paris, Milan, Barcelone: Masson, 1995. 524 p.
- Connors V. A. The schistosome — snail interaction: factors involved in host immunodefense activation and parasite killing in susceptible and resistant *Biomphalaria glabrata* // *Taxonomy, ecology and evolution of metazoan parasites*. T. I / Ed. by C. Combes, J. Jourddane. Perpignan: Presses Univ. de Perpignan, 2003. P. 203–224.

- Connors V. A., Lodes M. J., Yoshino T. P. Identification of *Schistosoma mansoni* sporocyst excretory — secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes // *Journ. Invertebr. Pathol.* 1991. Vol. 58. P. 387—395.
- Connors V. A., Yoshino T. P. In vitro effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on fagocytosis-stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata* // *Journ. Parasitol.* 1990. Vol. 76, N 6. P. 895—902.
- Cooper E. L. Immunity and neoplasia in Mollusks // *Isr. Journ. Med. Sci.* 1976. Vol. 12, N 45. P. 479—494.
- Davids B. G., Wu X.-J., Yoshino T. P. Cloning of a β integrin subunit cDNA from an embryonic cells line derived from the freshwater mollusk, *Biomphalaria glabrata* // *Gene*. 1999. Vol. 228. P. 213—223.
- Davids B. G., Yoshino T. P. Integrin-like RGD-dependent binding mechanism involved in the spreading response of circulating molluscan phagocytes // *Dev. Comp. Immunol.* 1998. N 22. P. 39—53.
- DeGaffee G., Loker E. S. Susceptibility of *Biomphalaria glabrata* to infection with *Echinostoma paraensei*: correlation with the effect of parasite secretory-excretory products on host hemocyte spreading // *Journ. Invertebr. Pathol.* 1998. Vol. 71. P. 64—72.
- Duclermortier P., Lardans V., Serra E., Trottein F., Dissouls C. *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells express a protein with domain homologous to the lectin domain of mammalian selectins // *Parasitol. Res.* 1999. N 85. P. 481—486.
- Fraser I. P., Ezekowitz R. A. B. Receptors for microbial products: carbohydrates // *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* / Ed. by J. I. Gallin, R. Snyderman. Philadelphia, 1999. P. 515—523.
- Glinski Z., Jarosz J. Molluscan immune defenses // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. 1997. Vol. 45, N 2—3. P. 149—155.
- Granath W. O., Yoshino J., Yoshino T. P. *Schistosoma mansoni*: Passive transfer of resistance by serum in the vector snail, *Biomphalaria glabrata* // *Exper. Parasitol.* 1984. N 58. P. 188—193.
- Hanh U. K., Bender R. C., Bayne C. J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species // *Journ. Parasitol.* 2001. Vol. 2, N 87. P. 292—299.
- Humbert E., Coustau C. Refractoriness of host haemocytes to parasite immunosuppressive factors as a putative resistance in the *Biomphalaria glabrata*—*Echinostoma caproni* system // *Journ. Parasitol.* 2001. Vol. 122. P. 651—660.
- Ishiyama I., Uhlenbruck G. On the nature of the anti-dextran activity of the *Helix pomatia* «anti-A» agglutinin // *Zeitschr. Naturforsch.* 1971. Bd 26B, H. 11. P. 1198—1199.
- Iwagana Y., Tsuji M. Studies on host-parasite relationship between *Schistosoma japonicum* and *Oncomelania* snails. 1. Antigenic communities between the Chinese strain of *Schistosoma japonicum* adult worm and *Oncomelania* snails // *Japan. Journ. Parasitol.* 1985. Vol. 34. P. 1—6.
- Janeway C. A., Travers P., Walport M., Schlomchik D. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5th ed. Current Biology Ltd. 2001. P. 213—221.
- Jourdane J., Cheng T. C. The two-phase recognition process of allografts in a Brazilian strain of *Biomphalaria glabrata* // *Journ. Invertebr. Pathol.* 1987. Vol. 49. P. 145—158.
- Knaap W. P. van der, Sminia T., Schutte R., Boerrigter-Barendsen L. H. Cytophilic receptor for foreignness and some factors which influence phagocytosis by invertebrate leucocytes: in vitro phagocytosis by amoebocytes of the snail *Lymnaea stagnalis* // *Immunology*. 1983. Vol. 48, N 2. P. 377—383.
- Knaap W. P. van der, Loker E. S. Immune mechanisms in trematode-snail interactions // *Parasitol. today*. 1990. Vol. 6, N 6. P. 176—182.
- Lie K. J., Heyneman D. Studies on resistance in snails: a specific tissue reaction to *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails // *Intern. Journ. Parasitol.* 1975 a. Vol. 5. P. 621—625.
- Lie K. J., Heyneman D. Studies on resistance in snails: a specific resistance induced by irradiated miracidia of *Echinostoma lindoense* in *Biomphalaria glabrata* snails // *Intern. Journ. Parasitol.* 1975 b. Vol. 5. P. 627—631.
- Lie K. J., Heyneman D. Studies on resistance in snails. 3. Tissue reaction to *Echinostoma lindoense* sporocysts in sensitized and resensitized *Biomphalaria glabrata* // *Journ. Parasitol.* 1976 a. Vol. 62, N 1. P. 51—58.

- Lie K. J., Heyneman D. Studies on resistance in snails. 6. Escape of *Echinostoma lindoense* sporocysts from encapsulation in the snail heart and subsequent loss of the host's ability to resist of the same parasit // *Journ. Parasitol.* 1976 b. Vol. 62, N 2. P. 298–302.
- Lie K. J., Heyneman D., Yau P. The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata* // *Journ. Parasitol.* 1975. Vol. 61, N 3. P. 574–576.
- Lodes M. J., Yoshino T. P. Polypeptides synthesized in vitro by *Biomphalaria glabrata* hemocytes bind to *Schistosoma mansoni* primary sporocysts // *Journ. Invertebr. Parasitol.* 1994. Vol. 71, N 1. P. 62–72.
- Loker E. S., Bayne C. J., Yui M. A. *Echinostoma paraensei*: hemocytes of *Biomphalaria glabrata* as targets of Echinostome mediated interference with host resistance to *Shistosoma mansoni* // *Exper. Parasitol.* 1986. Vol. 62. P. 149–154.
- Loker E. S., Cimino D. F., Hertel L. A. Excretory–secretory products of *Echinostoma paraensei* sporocysts mediate interference with *Biomphalaria glabrata* hemocyte function // *Journ. Parasitol.* 1992. Vol. 78, N 1. P. 104–115.
- Mouachid A., Mone H. Interference of *Echinoparyphium elegans* with the host-parasite system *Bulinus truncatus*-*Schistosoma bovis* in natural conditions // *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1990. Vol. 84, N 4. P. 341–348.
- Sire C., Rognon A., Theron A. Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? // *Parasitology.* 1998. Vol. 117. P. 117–122.
- Sullivan J. T., Hu P. C. Fate of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria obstructa* // *Journ. Parasitol.* 1996. Vol. 82, N 2. P. 743–747.
- Sullivan J. T., Spence J. V. Factors affecting adoptive transfer of resistance to *Schistosoma mansoni* in the snail intermediate host, *Biomphalaria glabrata* // *Journ. Parasitol.* 1999. Vol. 85, N 6. P. 1065–1071.
- Swarnakar S., Chowdhury P. S., Sarkar M. N-glycolylneuraminic acid specific lectin from *Pila globosa* snail // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. Vol. 178, N 1. P. 85–94.
- Yayne C. J., Boswell C. A., Loker E. S., Yui M. A. Plasma components which mediate cellular defenses in the gastropod mollusk, *Biomphalaria glabrata* // *Dev. Comp. Immunol.* 1985. Vol. 9, N 3. P. 523–530.

Российский государственный
педагогический институт им. Герцена,
НИИ экспериментальной медицины РАМН,
Санкт-Петербург

Поступила 7 X 2004

DEFENSIVE REACTIONS OF GASTROPOD MOLLUSCS. HUMORAL REACTIONS

G. L. Ataev, E. E. Eremina, A. V. Polevshchikov

Key words: Gastropoda, humoral reactions, peptides, ferment cascade, Trematoda, infection.

SUMMARY

Humoral protective reactions and their mechanisms in gastropod mollusks are considered based on the results of various investigations. It is important to note that lectines in molluscs, as well as in other invertebrates, are functional analogues of immunoglobulins in vertebrates.