



УДК 591.1

ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВИРОВАННЫХ КИСЛОРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ИММУННОГО ОТВЕТА У ЧЛЕНИСТОНОГИХ

В.В. Глупов^{1*}, И.А. Слепнева² и И.М. Дубовский¹

¹Институт систематики и экологии животных, Сибирское отделение Российской академии наук, ул. Фрунзе 11, 630091, Новосибирск, Россия; e-mail: skif@eco.nsc.ru

²Институт химической кинетики и горения, Сибирское отделение Российской академии наук, ул. Институтская 3, 630090, Новосибирск, Россия; e-mail: slepneva@kinetics.nsc.ru

РЕЗЮМЕ

В обзоре рассматривается генерация активированных кислородных метаболитов (АКМ), их свойства и источники в организме членистоногих, а также роль в формировании иммунного ответа против паразитов. При проникновении паразита в организм членистоногих происходит активация компонентов клеточного и гуморального иммунитета хозяина. Ключевые иммунные реакции протекают в лимфе при участии гемоцитов, которые опосредуют фагоцитоз, направленный на уничтожение небольших объектов, не превышающих размера самих гемоцитов, а также изоляцию и инактивацию более крупных объектов. При этом по каскадному принципу происходит активация ферментов фенолоксидазного комплекса, запускающих меланогенез, в результате которого образуется меланин. В процессе формирования меланина образуется ряд высокоактивных свободных кислородсодержащих радикалов, при контакте с которыми может происходить уничтожение паразита.

Ключевые слова: насекомые, паразит, гемолимфа, меланизация, инкапсуляция, активированные кислородные метаболиты, фенолоксидаза

GENERATION OF THE REACTIVE OXYGEN SPECIES DURING IMMUNE REACTIONS OF ARTHROPODS

V.V. Glupov^{1*}, I.A. Slepneva² and I.M. Dubovskiy¹

¹Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Frunze Str. 11, Novosibirsk, 630091, Russia; e-mail: skif@eco.nsc.ru

²Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institutskaya str., 3, Novosibirsk, 630090, Russia; e-mail: slepneva@kinetics.nsc.ru

ABSTRACT

Topics considered in this review include generation of reactive oxygen species (ROS), their features and sources in arthropods and the role of ROS in development of immune response against parasites. The cellular and humoral immune reactions of hosts are enhanced under parasite penetration. The main cellular defense refers to hemocyte-mediated immune responses like phagocytosis of small particles as well as isolation and destroying large particles

* Автор корреспондент / Corresponding author.

by encapsulation. These processes are accompanied by melanin formation as results of phenoloxidase activity and melanogenesis. In this review the melanogenesis is examined as one of the reasons of increased generation of ROS which have a high reaction activity and ability to destroy parasites.

Key words: insect, parasite, hemolymph, melanogenesis, encapsulation, reactive oxygen species, phenoloxidase

Механизмы, с помощью которых происходит уничтожение чужеродных организмов, в том числе и паразитов, а также собственных клеток членистоногих, можно разделить на два типа. Первый связан с образованием высоко-реакционных активированных кислородных метаболитов (АКМ), которые способны вызывать гибель клеток-мишеней. Под активированными кислородными метаболитами подразумевают широкий класс высокореакционных кислородных соединений радикальной и нерадикальной природы, образующихся в результате неполного восстановления молекулярного кислорода или изменения спина одного из его электронов, находящихся на внешних орбиталях (Halliwell et al. 1999; Зенков и др. 2001). Подобные соединения в организме членистоногих могут образовываться в результате ряда ферментативных реакций как в различных клетках, в том числе и в гемоцитах, так и непосредственно в лимфе (Nappi and Vass 1993, 1998; Nappi and Ottaviani 2000; Lavine and Strand 2002). Второй тип – это синтез различных белков и/или гликопротеинов, которые могут непосредственно вызывать структурные изменения в проникшем паразите. Например, лизоцим (фермент мурамидаза) может гидролизовать гликозидную связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетил-мурамовой кислотой, входящих в состав бактериальных клеток, что приводит к гибели бактерий (Hultmark 1996; Yu et al. 2002). Сюда же можно отнести вещества, которые не обладают ферментативной активностью, но способны взаимодействовать с мембраной или поверхностными структурами чужеродной клетки и изменять их свойства. В первую очередь это – антибактериальные и цитолитические белки (Engstrom 1999; Voman 2003; Dimopoulos 2003; Hetru et al. 2003).

Учитывая, что высокоактивные кислородсодержащие соединения играют существенную роль в иммунной системе многих животных, в том числе членистоногих, в данной статье мы рассмотрим только роль этих соединений при формировании иммунного ответа, их свойства и источники в организме членистоногих. Следует отметить, что

во всех живых организмах протекают реакции с образованием активированных кислородных метаболитов, таких как супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (HO^{\cdot}), оксид азота (NO^{\cdot}) и ряд других кислородсодержащих радикалов (RO_2^{\cdot}) (Владимиров и др. 1991; Bogdan et al. 2000; Зенков и др. 2001; Eberhard et al. 2002).

Все формы АКМ обладают высокой цитотоксичностью в отношении любых типов клеток и клеточных образований, что определяется их химической активностью. Можно выделить несколько наиболее вероятных мишеней окислительной цитотоксической «атаки» АКМ: в первую очередь, это – мембраны за счёт индукции процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) (Владимиров и др. 1991) и повреждения мембранных белков (Richards et al. 1988); во вторую очередь, это – инактивация ферментов (Drapier and Hibbs 1988) и повреждение ДНК клеток (Hoffman et al. 1984). Кроме того, АКМ могут участвовать в клеточной пролиферации (Cross and Jones 1991) и регуляции метаболических процессов в качестве внутриклеточных мессенджеров (Nappi et al. 2000; Qazi and Trimmer 1999).

Среди основных путей генерации и конверсии АКМ следует отметить несколько механизмов. Так, заметные количества супероксида образуются в реакциях, катализируемых некоторыми окислительными ферментами: NAD(P)H-оксидазой, ксантинооксидазой, альдегидоксидазой и др. (Fridovich 1979; Halliwell and Gutteridge 1999; Зенков и др. 2001). Помимо этого, источниками $O_2^{\cdot-}$ в организме являются дыхательные цепи переноса электронов (Зенков и др. 2001). В частности, в гемоцитах таракана *Blaberus discoidalis*, а также 6 видов представителей отряда Lepidoptera было зарегистрировано образование супероксид-аниона (Arakawa 1994, 1995a, b; Whitten and Ratcliffe 1999). Вероятно, одним из основных источников супероксид-аниона у членистоногих являются митохондриальные и микросомальные структуры клеток, хотя не исключено, что источником супероксид-аниона могут быть также промежу-

точные продукты меланогенеза, в первую очередь – окислительно-восстановительные реакции хинонов, которые могут происходить неферментативно или при участии ферментов через образование семихиноновых соединений. В этом случае можно провести параллель с митохондриальным синтезом супероксида при участии убихинона. В водной среде в результате дисмутазной реакции супероксид достаточно быстро ($\tau_{1/2} \approx 10^{-6}$ с, 37°) образует перекись водорода и O_2 (Reiter 1995).

Токсичен ли супероксидный анион сам по себе или же он является лишь предшественником перекиси водорода, разложение которой ионами переходных металлов (реакция Фентона) приводит к образованию гидроксильного радикала, токсичность которого сомнений не вызывает? Однозначного ответа на этот вопрос в настоящее время нет (Klebanoff 1974; DiGuiseppi 1982). Цитотоксическое действие супероксида ограничивается его неспособностью проникать сквозь клеточную мембрану, так как при физиологических рН $O_2^{\cdot-}$ является заряженной частицей, и, соответственно, его диффузия сквозь клеточную мембрану затруднена (Gus'kova et al. 1984). В то же время перекись водорода, являясь нейтральной молекулой, может беспрепятственно проникать во внутриклеточное пространство через аквапориновые каналы (Viner et al. 2006), повреждая клетку изнутри.

Таким образом, имеющиеся в литературе данные не позволяют сделать однозначный вывод о токсичности супероксидного аниона самого по себе. В любом случае реакции восстановления и дисмутации $O_2^{\cdot-}$ приведут к образованию перекиси водорода и, возможно, гидроксильного радикала. В итоге можно заключить, что токсичность кислорода обуславливается сложными процессами, включающими в себя образование всех интермедиатов восстановления молекулярного кислорода до воды.

Следует отметить, что у ряда видов членистоногих продукция АКМ была зарегистрирована как в ответ на действие различных иммунных модуляторов (компонентов клеточных стенок микроорганизмов, нейлоновых шариков и пр.), так и при развитии инфекционного процесса (Carton et al. 2008). В частности показано, что увеличение генерации АКМ происходит при развитии паразитозов у мух *Drosophila* (Nappi et al. 1995, 2000). Повышение генерации АКМ в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* было зарегистрировано

нами при развитии микозов и микроспоридиозов (Glupov et al. 2003; Лозинская и др. 2004). Установлена ключевая роль АКМ в инкапсуляции и уничтожении *Plasmodium melanotic* у комара *Anopheles gambiae* (Lanz-Mendoza et al. 2003; Kumar et al. 2004). Показана повышенная генерация в гемолимфе насекомых перекиси водорода и других АКМ в ответ на инъекцию личинкам *G. mellonella* убитых бактериальных клеток (Комаров и др. 2006), а также при ранении и в процессе развития инкапсуляции нейлоновых имплантантов (Рис. 1) (Дубовский И.М., неопубл.).

Известно, что основное количество АКМ при развитии иммунных реакций у членистоногих образуется в процессе меланогенеза и, в первую очередь, при инкапсуляции или гранулообразовании чужеродных организмов. Образование меланотической капсулы вокруг паразитов (процесс инкапсуляции) является одним из ключевых в формировании иммунного ответа членистоногих и представляет собой многоэтапный процесс, который начинается после активации ферментов фенолоксидаз (ФО). Эти ферменты катализируют первоначальные реакции в процессах меланизации и/или склеротизации (Рис. 2).

Среди ключевых молекул, обеспечивающих процесс меланизации, следует выделить катехоламины и другие биогенные амины – производные тирозина (Ashida and Yamazaki 1990; Wilson et al. 2001; McGraw 2003). Помимо меланизации, эти молекулы могут обеспечивать другие жизненно важные процессы членистоногих, включая нейрореперечу (Owen and Bouquillon 1992; Noguchi et al. 1995), склеротизацию кутикулы (Sugumaran and Nelson 1998) и образование танина в хорионе яиц (Li 1994). Большое значение при меланизации производные тирозина приобретают, выступая субстратом для ФО и включаясь в виде эумеланина и склеротина в состав пигментированных капсул вокруг паразита (Soderhall and Smith 1986; Nappi and Vass 1993; Carton and Nappi 1997; Wilson et al. 2001). На первом этапе меланогенеза происходит гидрокселирование тирозина в дигидрокси-фенилаланин (ДОФА), затем – окисление ДОФА в ДОФАхинон (Бриттон 1986; Nappi and Vass 1993; Zhao et al. 1995; Nappi and Ottaviani 2000). Последующие реакции, приводящие к образованию нерастворимого эумеланина, протекают без участия фермента (Бриттон 1986). Хотя у членистоногих в последующие этапы меланогенеза могут вклю-

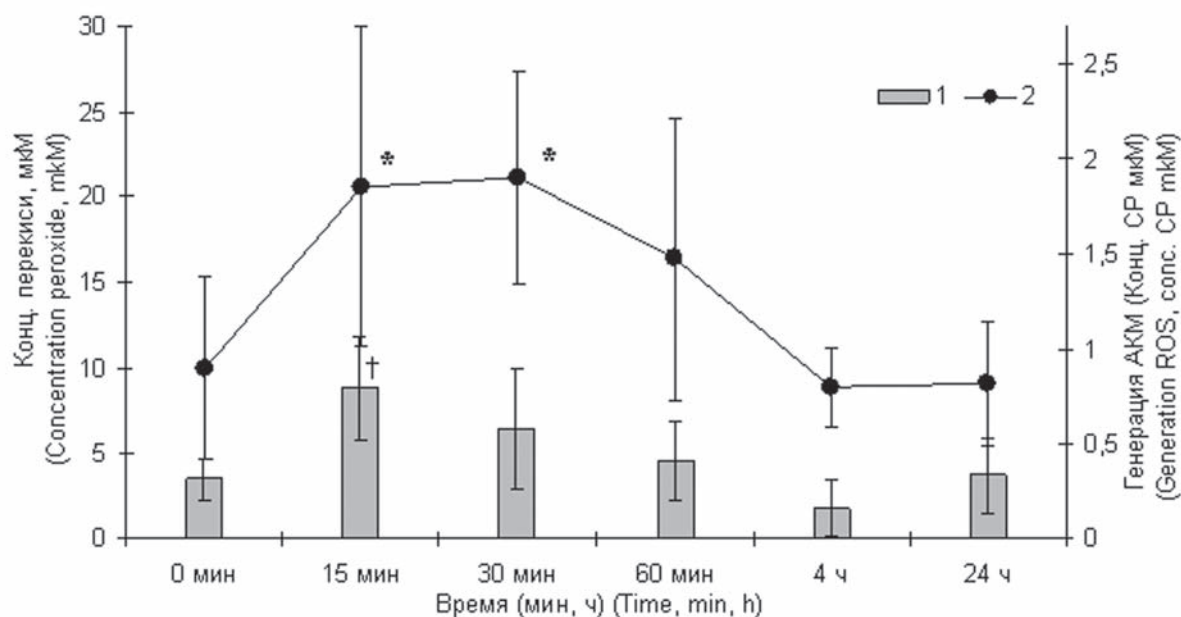


Рис. 1. Увеличение концентрации перекиси водорода (1) и скорости генерации АКМ (2) в гемолимфе при инкапсуляции у личинки *Galleria mellonella* после введения нейлонового имплантата через прокол в кутикуле ($n = 15$ для каждого варианта; * обозначает статистическую значимость $p \leq 0.01$ между обозначенными вариантами и вариантами 0, 4 и 24 ч; † обозначает статистическую значимость $p \leq 0.01$ между обозначенным вариантом и вариантами 0, 1, 4 и 24 ч).

Fig. 1. Increase of hydrogen peroxide concentration (1) and ROS generation (2) in hemolymph of *Galleria mellonella* during encapsulation of nylon implant injected through cuticle ($n = 15$; * $p \leq 0.01$ between marked variants and 0, 4 and 24 h; † $p \leq 0.01$ between marked variants and 0, 1, 4 and 24 h).

чатся различные ферменты (Nappi and Vass 1993; Sugumaran and Bolton 1998; Sugumaran 2002), ДОФАхинон, являясь неустойчивой молекулой, быстро циклизуется в лейкоДОФАхром. Окисление лейкоДОФАхрома ДОФАхиноном приводит к образованию ДОФАхрома, затем последовательно образуются 5,6-дигидроксииндол, индолил-5,6-хинон и конечный продукт – эумеланин. В присутствии ионов двухвалентных металлов из ДОФАхрома образуется 5,6-дигидроксииндол-2-уксусная кислота (Nappi and Vass 1993). Фенолоксидаза, а также пероксидаза могут окислять индолы в соответствующие хиноны (индолил-5,6-хинон и индолил-5,6-хинон-2-уксусная кислота), которые полимеризуются и образуют эумеланин (Nappi and Vass 1993). В сущности, эумеланин представляет собой линейный полимер индолил-5,6-хинона, хотя в данном полимере может присутствовать и небольшое количество пиррольных мономеров, ДОФА и ДОФА-хиноновых фрагментов (Бриттон 1986; Nappi and Vass 1993).

Если же учитывать, что процессы меланогенеза протекают в среде, где находится большое количе-

ство тиол-содержащих компонентов (глутатион, цистеин, белки), а различные промежуточные продукты меланогенеза способны взаимодействовать с сульфгидрильными группами, то не удивительно, что в состав меланотической капсулы или меланотического тромба в поврежденной кутикуле, кроме меланина и склеротина, входят белки и аминокислоты (Nappi and Vass 1993). Возможно, разнообразные белки (как чужеродные, так и собственные) могут выступать матрицей для полимерной реакции окислительной конденсации индолил-хинонов (Бриттон 1986).

Подробнее останавливаясь на значении ФО в процессах меланизации и склеротизации необходимо указать, что инициация первых стадий биосинтеза эумеланина происходит при участии двух типов фенолоксидаз (тирозиназ): ЕС 1.14.18.1, моно- и дифенолоксидазы, о-дифенол: O_2 -оксидоредуктазы и ЕС 1.10.3.1, дифенолоксидазы, катехолоксидазы, о-дифенол: O_2 -оксидоредуктазы (Sugumaran and Bolton 1995, 1998). Эти ферменты представляют собой семейство медь-содержащих белков, которые, подобно гемоцианину, взаимо-

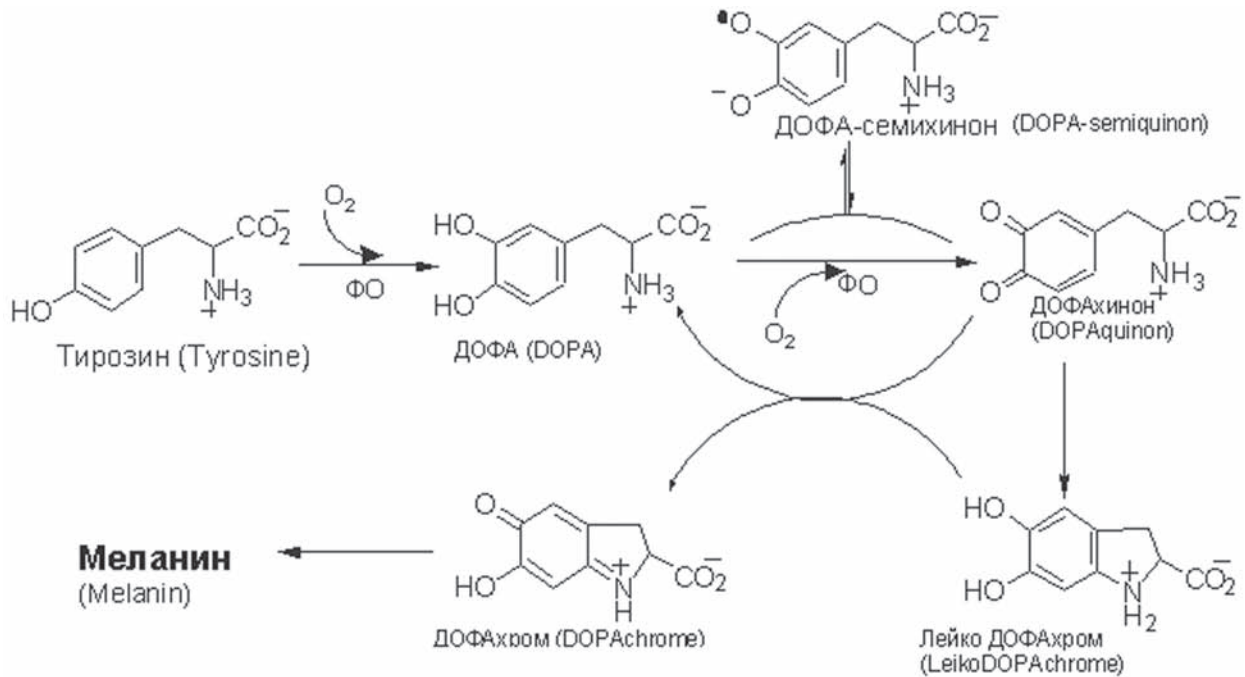


Рис. 2. Интермедиаты, образующиеся при меланогенезе, в частности, на ранних стадиях окисления дигидроксифенилаланина (ДОФА) фенолоксидазой.

Fig. 2. Outline of melanogenesis. Production of intermediates during early stages of 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA) oxidation by phenoloxidase.

действуют с кислородом (Ashida and Yamazaki 1990). В первые стадии меланогенеза также могут вовлекаться пероксидазы, которые способны окислять монофенолы, аминифенолы, о- и п-дифенолы (Nappi and Vass 1993; Li et al. 1996). Есть данные, указывающие на способность самих фенолоксидаз проявлять пероксидазную активность в присутствии как монофенолов (Yamazaki et al. 2004), так и дифенолов (Mastore et al. 2005).

У членистоногих фенолоксидаза локализована в гемолимфе (лимфа и гемоциты) и кутикуле (Ashida and Brey 1998). В кутикуле, кроме перечисленных ферментов, зарегистрирован третий тип ФО – лакказы (ЕС 1.10.3.2., п-дифенол: O₂-оксидоредуктаза) (Ashida and Yamazaki 1990; Nappi and Vass 1993; Ashida and Brey 1998). Данный фермент участвует в процессах формирования кутикулы насекомых, окисляя фенилендиамины и полифенолы, однако он не гидроксилирует тирозин. Лакказа так же, как и другие ФО, представляет собой медь-содержащий белок.

ФО встречаются в форме инактивированных проферментов, профенолоксидазы (проФО), ко-

торые активируются при ограниченном протеолизе (Ashida and Yamazaki 1990; Soderhall 1999). Активирование проФО в организме членистоногих происходит при помощи многоступенчатого каскада ферментативных реакций, который назван фенолоксидазной активирующей системой или профенолоксидазным каскадом (ПФК). В свою очередь, активирование основных ферментов ПФК сериновых протеиназ происходит в плазме под действием субстанций биотического и абиотического происхождения, таких как компоненты микробных клеточных стенок, паразитов, aberrantных тканей, нейлоновых волокон и т.д., а также при наличии двухвалентных ионов Ca²⁺ (Ashida and Brey 1998; Soderhall and Cerenius 1998; Kwon et al. 2000). Кроме того, активирование ПФК может происходить под действием составных компонентов клеточных стенок микроорганизмов, таких как пептидогликаны, липополисахариды (ЛПС) и β-1,3-гликаны (Ashida and Yamazaki 1990). Следует отметить, что активация ПФК может происходить только под действием гликанов с β-1,3 связью. Другие полимеры глюко-

зы (например, с α - или β -1,4 связью) не способны активировать ПФК (Voman et al. 1991). В процессы активации ФО могут вовлекаться белки и лектины как эндогенной, так и экзогенной природы (Chen et al. 1995).

Следует отметить, что взаимодействие лектина с протеазами и/или компонентами проФО не опосредовано олигосахаридными остатками гликопротеина, так как сахара (ингибиторы агглютинирующей активности лектина) не снижают эффективности активации проФО или протеаз (Chen et al. 1995). Не исключено, что эндогенные лектины, в том числе представленные в виде рецепторов на поверхности гемоцитов, могут участвовать в регуляции ПФК, возможно, через регуляцию активности ингибиторов протеаз (Gap et al. 2001; Zhu et al. 2003).

В результате описанных реакций образуется сложная меланотическая капсула вокруг паразита или меланотический тромб в месте повреждения кутикулы. Во время каскада ферментативных реакций, приводящих к образованию меланина, возникает ряд промежуточных высокорекреационных продуктов, опосредующих киллерный механизм при инкапсуляции и гранулообразовании. Например, цитотоксичные тригидроксифенолы (6-дигидроксиДОФА или 6-дигидроксиДОФАамин) могут генерироваться при взаимодействии ДОФА или ДоФААмина, либо их хинонов, с водой (Nappi and Vass 1993). Кроме того, были обнаружены антибактериальные и фунгицидные свойства меланинов (Soderhall and Ajaxon 1982). Известно, что при ферментативном окислении катехолов, в том числе ДОФА, происходит образование семихиноновых радикалов (Рис. 2) (Kalyanaraman and Sealy 1982; Kalyanaraman et al. 1984). Некоторые авторы предполагают, что семихиноновые интермедиаты процесса меланизации, например ДОФА-семихиноновый радикал, могут взаимодействовать с молекулярным кислородом с образованием супероксид-аниона (Nappi et al. 1995; Nappi and Vass 1993; Nappi and Christensen 2005). В наших исследованиях предпринимались попытки зарегистрировать образование супероксида в процессе меланизации в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* и *Dendrolimus superans sibiricus* с помощью спиновых ловушек PBN, DMPO и DEPMPO, а также с помощью пространственно затрудненного гидроксилamina CP-H (Slepneva et al. 1999). Зарегистрировать образование $O_2^{\cdot-}$ в гемолимфе

этими методами не удалось. Ранние исследования с помощью электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) указывают на присутствие небольшого количества свободных радикалов (возможно, семихиноновых структур) в эумеланине (Бриттон 1986). Наличие подобных соединений в эумеланине, вероятно, определяет его бактерицидные и фунгицидные свойства. Полученные нами результаты позволяют заключить, что и в гемолимфе насекомых процесс меланизации сопровождается образованием ДОФА-семихинонового радикала (Slepneva et al. 2003; Komarov et al. 2005). Для регистрации короткоживущего ДОФА-семихинонового радикала в процессе меланизации в гемолимфе насекомых нами был применен метод спиновой стабилизации орто-семихинонов. При окислении ДОФА в гемолимфе *G. mellonella* в присутствии ионов Mg^{2+} наблюдали спектр ЭПР, приведенный на Рис. 3. Образование ДОФА-семихинона в гемолимфе *G. mellonella* являлось следствием активности фенолоксидазы, так как при добавлении в гемолимфу фенолтиомочевины (специфичного ингибитора фенолоксидазы) ЭПР спектр ДОФА-семихинонового радикала не наблюдался. Принимая во внимание токсические свойства о-семихинонов, можно предположить, что генерация этих частиц в процессе меланизации играет важную роль в реализации микробицидного действия при инкапсуляции патогенных организмов в гемолимфе насекомых.

Следует отметить, что в кутикуле дифенолы могут деаминироваться перед полимеризацией, вследствие чего структура меланина в кутикуле будет значительно отличаться от меланина, образованного в ходе ферментативных реакций в гемолимфе при инкапсуляции или формировании тромба после повреждения кутикулы (Bursel 1970).

При активировании ферментативных реакций ПФК исключительное значение играет «слаженная» работа регуляторных механизмов и, в первую очередь, контролирующих выработку ингибиторов ПФК. Если подобное звено будет отсутствовать или его активность будет существенно снижена, то даже при незначительном повреждении произойдет меланизация всей гемолимфы и, соответственно, гибель особи. В ряде случаев паразиты могут сами синтезировать ингибиторы ФО или ПФК или индуцировать образование подобных ингибиторов непосредственно клет-

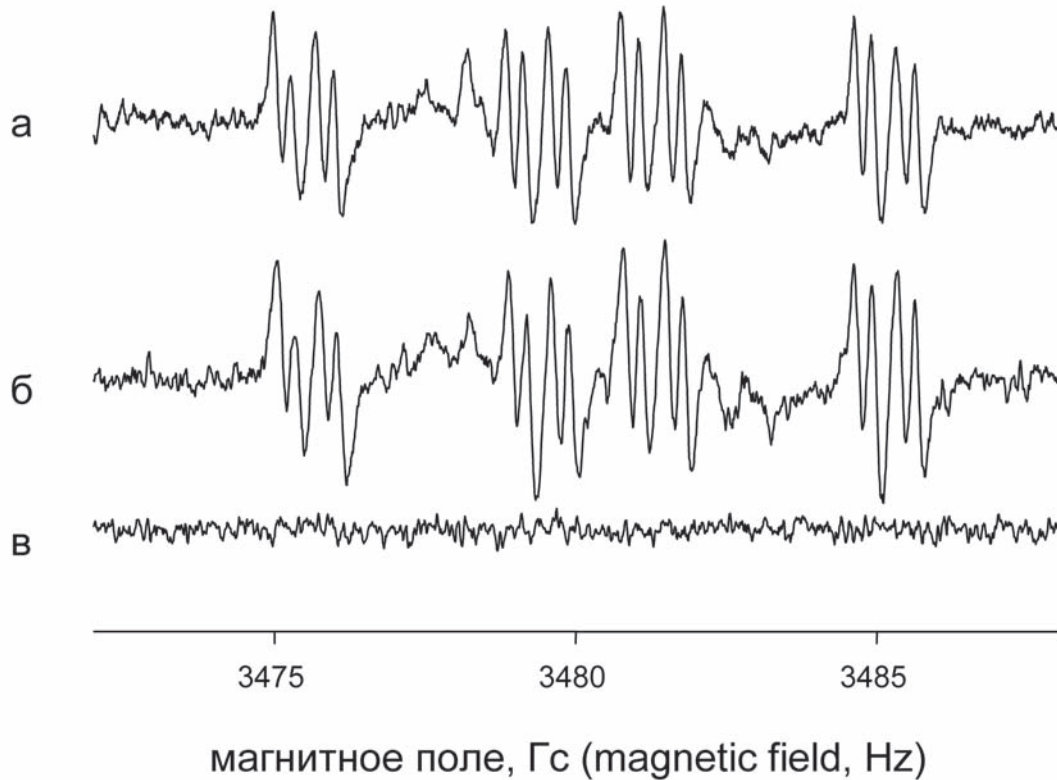


Рис. 3. Спектры ЭПР ДОФА-семихинонового радикала, полученные в присутствии ионов Mg^{2+} при окислении ДОФА в гемолимфе *Galleria mellonella* (а) и очищенной грибной фенолоксидазой (б), (в) – то же, что (а), но в присутствии фенилтиомочевины.

Fig. 3. EPR spectra of DOPA-semiquinone obtained in the presence of Mg^{2+} during DOPA oxidation in *Galleria mellonella* hemolymph (a) and by phenoloxidase from mushroom (b), (c) – the same as (a) but with phenylthiourea.

ками хозяина. Например, в гемолимфе личинок малярийных комаров *Anopheles gambiae*, чувствительных к *Plasmodium*, присутствует фактор, предотвращающий меланизацию чужеродных веществ (Paskewitz and Riehle 1998). При изучении влияния энтомофагов (эктопаразитов) *Habrobracon hebetor* на клеточный иммунитет личинок большой вошинной огневки *Galleria mellonella* мы установили, что на фоне активного подавления профенолоксидазного комплекса в гемоцитах и ингибирования системы генерации АКМ сохраняется ряд ключевых функций иммунной системы (Крюкова и др. 2007). Также установлено, что в острую фазу микроспориоза (спорогония) происходит ингибирование профенолоксидазного каскада в гемолимфе насекомого хозяина. В частности, показано, что скорость образования АКМ в гемолимфе зараженных на-

секомых достоверно не изменяется в течение 3 и 6 суток после заражения (на стадии мерогонии). Однако через 13 суток после заражения, когда отмечался массовый выброс спор микроспоридий в гемолимфу и разрушение жирового тела, была зарегистрирована пониженная генерация АКМ в гемолимфе зараженных насекомых (Рис. 4).

Кроме того, ряд паразитов может влиять на уровень различных доноров электронов, таких как α -кетоглутарат, НАДФН, флавопротеины, о-дифенолы и т.д., которые существенно влияют на течение меланогенеза (Nappi and Vass 1993). Например, НАДФН может ингибировать образование ДОФАхрома. Не исключено, что паразиты также могут синтезировать антиоксидантные вещества, например аскорбаты, которые способны полностью ингибировать окисление ДОФА в ДОФАхром (Nappi and Vass 1993). Однако к

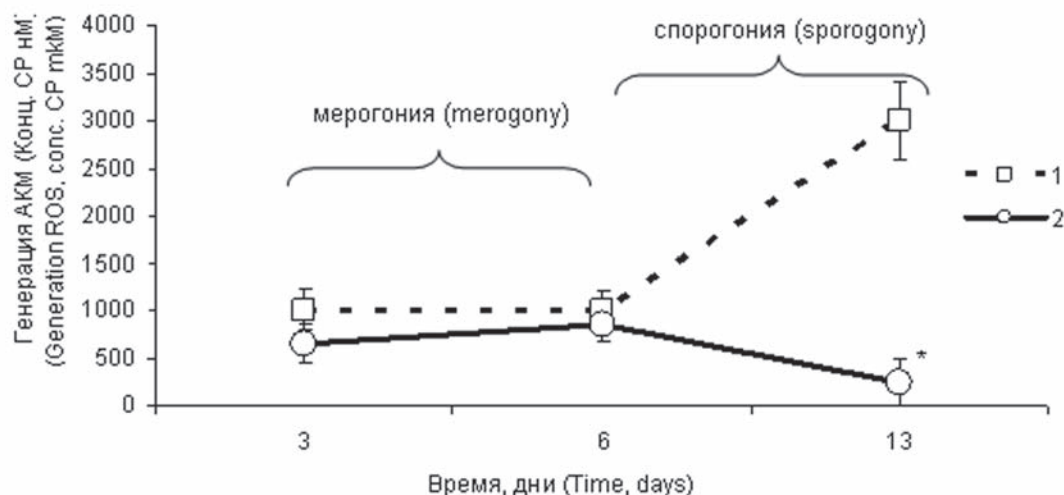


Рис. 4. Генерация АКМ в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* на различных этапах развития микроспориоза *Vairimorpha ephestiae* (1 – контроль; 2 – особи, зараженные микроспоридиями; * $p \leq 0.01$ по сравнению с контролем).

Fig. 4. Generation of ROS in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae during microsporidiosis *Vairimorpha ephestiae* (1 – control; 2 – specimens infected with microsporidia; * $p \leq 0.01$ as compared to control).

настоящему времени очень мало известно о влиянии паразитов на катаболизм катехоламинов и других производных тирозина, а существующие отрывочные данные не дают полного представления об изменении этих процессов во время патогенеза.

Таким образом, фенолоксидазо-активирующая система участвует в различных стадиях ферментативного синтеза меланина и склеротина, которые могут выступать не только в качестве физических барьеров при инкапсуляции паразитов, но и, обладая бактерицидными и фунгицидными свойствами, непосредственно действовать на проникших в организм членистоногих паразитов. Кроме того, промежуточные продукты меланогенеза могут как непосредственно влиять на паразитов, так и взаимодействовать с различными молекулами, образуя высокореакционные соединения, в том числе и свободные радикалы, обладающие цитотоксичностью.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проведены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 09-04-00380 и 09-04-01582), Президентского гранта № 02.120.11.484, «Интеграция» СО РАН, гранта № 46.

ЛИТЕРАТУРА

- Владимиров Ю.А., Азизова О.А. и Деев А.И. 1991.** Свободные радикалы в живых системах. *Итоги науки и техники. Серия Биофизика*, **29**: 1–249.
- Бриттон Г.Б. 1986.** Биохимия природных пигментов. Мир, Москва, 422 с.
- Глулов В.В., Комаров Д.А., Слепнева И.А., Дубовский И.М., Гризанова Е.В. и Храпцов В.В. 2006.** Генерация супероксидного радикала и перекиси водорода в гемолимфе насекомых в процессе иммунного ответа. *Доклады академии наук*, **411**: 420–423.
- Зенков Н.К., Ланкин В.З. и Меньщикова Е.Б. 2001.** Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты. МАИК, Москва, 343 с.
- Крюкова Н.А., Дубовский И.М., Гризанова Е.В., Глулов В.В. и Наумкина Е.А. 2007.** Формирование клеточного иммунного ответа *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) при паразитировании *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). *Евразийский энтомологический журнал*, **6**: 361–364.
- Лозинская Я.Л., Слепнева И.А., Храпцов В.В. и Глулов В.В. 2004.** Изменение антиоксидантного статуса и системы генерации свободных радикалов в гемолимфе личинок *Galleria mellonella* при микроспориозе. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*, **40**: 99–103.
- Arakawa T. 1994.** Superoxide generation in vitro in lepidopteran larval haemolymph. *Journal of Insect Physiology*, **40**: 165–171.

- Arakawa T. 1995a.** Possible involvement of an enzymatic system for superoxide generation in lepidopteran larvae haemolymph. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **29**: 281–291.
- Arakawa T. 1995b.** Superoxide generative reaction in insect haemolymph and its mimic model system with surfactants in vitro. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **25**: 247–253.
- Ashida M. and Brey P.T. 1998.** Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: P.T. Brey and D. Hultmark (Eds.). *Molecular mechanisms of immune responses in insects*. Chapman & Hall, London: 135–172.
- Ashida M. and Yamazaki H.I. 1990.** Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. In: E. Ohnishi and H. Ishizaki (Eds.). *Molting and Metamorphosis*. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo; Springer-Verlag, Berlin: 239–270.
- Bienert G.P., Schjoerring J.K. and Jahn T.P. 2006.** Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**: 994–1003.
- Bogdan C., Röllinghoff M. and Diefenbach A. 2000.** The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological Reviews*, **173**: 17–26.
- Boman H.G. 2003.** Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of International Medical Research*, **254**: 197–215.
- Boman H.G., Faye I., Gudmundsson G.H., Lee J.Y. and Lindholm D.A. 1991.** Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins. *European Journal of Biochemistry*, **201**: 23–31.
- Bursel E. 1970.** *An introduction to insect physiology*. Academic Press, London, New York, 276 p.
- Carton Y. and Nappi A.J. 1997.** *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitology Today*, **13**: 218–227.
- Carton Y., Poirié M. and Nappi A.J. 2008.** Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Science*, **15**: 67–87.
- Chen C., Durrant H.J., Newton R.P. and Ratcliffe N.A. 1995.** A study of novel lectins and their involvement in the activation of the prophenoloxidase system in *Blattella discoidalis*. *Biochemical Journal*, **310**: 23–31.
- Cross A.R. and Jones O.T.G. 1991.** Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1057**: 281–298.
- DiGuiseppi J. 1982.** Oxygen toxicity in *Streptococcus sanguis*. The relative importance of superoxide and hydroxyl radicals. *Journal of Biological Chemistry*, **257**: 4046–4051.
- Dimopoulos G. 2003.** Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions. *Cellular Microbiology*, **5**: 3–4.
- Drapier J.C. and Hibbs J.B. 1988.** Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron sulphur enzymes in the macrophage effector. *Journal of Immunology*, **140**: 2829–2838.
- Eberhard W., Beck K.-F. and Pfeilschifter J. 2002.** Cytokine-induced expression of tPA is differentially modulated by NO and ROS in rat mesangial cells. *Kidney International*, **61**: 20–30.
- Engstrom Y. 1999.** Induction and regulation of antimicrobial peptides in *Drosophila*. *Developmental and Comparative Immunology*, **23**: 345–358.
- Fridovich I. 1979.** Superoxide radicals, superoxide dismutases and the aerobic lifestyle. *Photochemistry and Photobiology*, **28**: 733–741.
- Gan H., Wang Y., Jiang H., Mita K. and Kanost M.R. 2001.** A bacteria-induced, intracellular serpin in granular hemocytes of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **31**: 887–898.
- Glupov V.V., Slepneva I.A., Serebrov V.V., Khvoschevskay M.F., Martem'yanov V.V., Dubovskiy I.M. and Khramtsov V.V. 2003.** Influence of the fungal infection on the production of reactive metabolites and the antioxidant state of haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Russian Entomological Journal*, **12**: 103–108.
- Gus'kova R.A., Ivanov I.I. and Kol'tover V.K. 1984.** Permeability of bilayer lipid membranes for superoxide radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, **778**: 579–585.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. 1999.** *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, 936 p.
- Hetru C., Troxler L. and Hoffmann J.A. 2003.** *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *Journal of Infectious Diseases*, **187**(S2): 27–34.
- Hoffman M.E., Mello-Filho A.C. and Meneghini R. 1984.** Correlation between cytotoxic effect of hydrogen peroxide and the yield of DNA strand breaks in cells of different species. *Biochimica et Biophysica Acta*, **781**: 234–238.
- Hultmark D. 1996.** Insect lysozymes. In: P. Jolleás (Ed.). *Lysozymes: model enzymes in biochemistry and biology*. Birkhäuser Verlag, Basel: 87–104.
- Kalyanaraman B. and Sealy R.C. 1982.** Electron spin resonance – spin stabilization in enzymatic systems: detection of semiquinones produced during peroxidatic oxidation of catechols and catecholamines. *Biochimica et Biophysica Research Communications*, **106**: 1119–1125.
- Kalyanaraman B., Felix C.C. and Sealy R.C. 1984.** Peroxidatic oxidation of catecholamines. A kinetic electron spin resonance investigation using the spin stabilization approach. *Journal of Biological Chemistry*, **259**: 7584–7589.
- Klebanoff S.J. 1974.** Role of the superoxide anion in the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *Journal of Biological Chemistry*, **249**: 3724–3728.
- Komarov D.A., Slepneva I.A., Glupov V.V. and Khramtsov V.V. 2005.** Detection of free radicals forma-

- tion in haemolymph of insects by EPR spectroscopy. *Applied Magnetic Resonance*, **28**: 411–419.
- Komarov D.A., Slepneva I.A., Glupov V.V. and Khramtsov V.V. 2005.** Superoxide and hydrogen peroxide formation during enzymatic oxidation of DOPA by phenoloxidase. *Free Radical Research*, **39**: 853–858.
- Kumar S., Cristophides G.K., Cantera R., Charles B., Han Y.S., Meister S., Dimopoulos G., Kafatos F.C. and Barillas-Mury C. 2003.** The role of reactive oxygen species on *Plasmodium* melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**: 14139–14144.
- Kwon T.H., Kim M.S., Choi H.W., Joo C.H., Cho M.Y. and Lee B.L. 2000.** A masquerade-like serine proteinase homologue is necessary for phenoloxidase activity in the coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *European Journal of Biochemistry*, **267**: 6188–6196.
- Lanz-Mendoza H., Hernandez-Martinez S., Ku-Lopez M., Rodriguez M.D., Herrera-Ortiz A. and Rodriguez M.H. 2002.** Superoxide anion in *Anopheles albimanus* hemolymph and midgut is toxic to *Plasmodium berghei* ookinetes. *Journal of Parasitology*, **88**: 702–706.
- Lavine M.D. and Strand M.R. 2002.** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**: 1295–1309.
- Li J.Y. 1994.** Egg chorion tanning in *Aedes aegypti* mosquito. *Comparative Biochemistry and Physiology, A Physiology*, **109**: 835–843.
- Li J.Y., Hodgeman B.A. and Christensen B.M. 1996.** Involvement of peroxidase in chorion hardening in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **26**: 309–317.
- Mastore M., Kohler L. and Nappi A.J. 2005.** Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidation of DOPA and dopamine. *FEBS Journal*, **272**: 2407–2415.
- McGraw K.J. 2003.** Melanins, metals, and mate quality. *Oikos*, **102**: 402–406.
- Nappi A.J. and Christensen B.M. 2005.** Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect cellular immune reactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**: 443–459.
- Nappi A.J. and Ottaviani E. 2000.** Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates *BioEssay*, **22**: 469–480.
- Nappi A.J. and Vass E. 1993.** Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Research*, **3**: 117–126.
- Nappi A.J., Vass E., Frey F. and Carton Y. 1995.** Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology*, **68**: 450–456.
- Nappi A.J. and Vass E. 1998.** Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *Journal of Parasitology*, **84**: 1150–1157.
- Nappi A.J., Vass E., Frey F. and Carton Y. 2000.** Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide*, **4**: 423–430.
- Noguchi H., Hayakawa Y. and Downer R. G. H. 1995.** Elevation of dopamine levels in parasitized insect larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **25**: 197–201.
- Owen M. D. and Bouquillon A. I. 1992.** The synthesis of L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) in the cerebral ganglia of the cockroach, *Periplaneta americana* L. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **22**: 193–198.
- Paskewitz S.M. and Riehle M. 1998.** A factor preventing melanization of sephadex CM C-25 beads in *Plasmodium*-susceptible and refractory *Anopheles gambiae*. *Experimental Parasitology*, **90**: 34–41.
- Qazi S. and Trimmer B.A. 1999.** The role of nitric oxide in motoneuron spike activity and muscarinic-evoked changes in cGMP in the CNS of larval *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Physiology*, **185**: 539–550.
- Reiter R.J. 1995.** Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB Journal*, **9**: 526–533.
- Richards D.M., Dean R.T. and Jessup W. 1988.** Membrane proteins are critical targets in free radical mediated cytolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **946**: 281–288.
- Slepneva I. A., Komarov D.A., Glupov V.V., Serebrov V.V. and Khramtsova V.V. 2003.** Influence of fungal infection on the DOPA-semiquinone and DOPA-quinone production in haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **300**: 188–191.
- Slepneva I.A., Glupov V.V., Sergeeva S.V. and Khramtsov V.V. 1999.** EPR detection of reactive oxygen species in hemolymph of *Galleria mellonella* and *Dendrolimus superans sibiricus* (Lepidoptera) larvae. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **264**: 212–215.
- Soderhall K. 1999.** Invertebrate immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, **23**: 263–266.
- Soderhall K. and Ajaxon R. 1982.** Effect of quinones and melanin on mycelial growth of *Aphanomyces* spp. and extracellular protease of *Aphanomyces astaci* a parasite on crayfish. *Journal of Invertebrate Pathology*, **39**: 105–109.
- Soderhall K. and Cerenius L. 1998.** Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, **10**: 23–28.
- Soderhall K. and Smith V.J. 1986.** The prophenoloxidase activating system: the biochemistry of its activation and role in *Arthropod* cellular immunity with special reference to *Crustaceans*. In: M. Brehelin (Ed.). *Immunity in invertebrates*. Springer-Verlag, Berlin: 208.
- Sugumaran M. 2002.** Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Research*, **15**: 2–9.

- Sugumaran M. and Bolton L. 1995.** Direct evidence for quinone-quinone methide tautomerism during tyrosinase catalyzed oxidation of 4-allylcatechol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **213**: 469–474.
- Sugumaran M. and Bolton L. 1998.** Laccase—and not tyrosinase—is the enzyme responsible for quinone methide production from 2,6-dimethoxy-4-allyl phenol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **353**: 207–212.
- Sugumaran M. and Nelson E. 1998.** Model sclerotization studies. 4. Generation of N-acetylmethionyl catechol adducts during tyrosinase-catalyzed oxidation of catechols in the presence of N-acetylmethionine. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **38**: 44–52.
- Whitten M.M.A. and Ratcliffe N.A. 1999.** In vitro superoxide activity in the haemolymph of the *West Indian leaf cockroach*, *Blaberus discoidalis*. *Journal of Insect Physiology*, **45**: 667–675.
- Wilson K., Cotter S.C., Reeson A.F. and Pell J.K. 2001.** Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters*, **4**: 637–649.
- Yamazaki Sh., Morioka Ch. and Itoh Sh. 2004.** Kinetic evaluation of catalase and peroxygenase activities of tyrosinase. *Biochemistry*, **43**: 11546–11553.
- Yu K.H., Kim K.N., Lee J.H., Lee H.S., Kim S.H., Cho K.Y., Nam M.H. and Lee I.H. 2002.** Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Developmental and Comparative Immunology*, **26**: 707–713.
- Zhao X., Ferdig M.T., Li J. and Christensen B.M. 1995.** Biochemical pathway of melanotic encapsulation of *Brugia malayi* in the mosquito, *Armigeres subalbatus*. *Developmental and Comparative Immunology*, **19**: 205–215.
- Zhu Y., Wang Y., Gorman M.J., Jiang H. and Kanost M.R. 2003.** *Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase-activating proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 46556–46564.

Представлена 12 февраля 2009; принята 1 июня 2009.