УДК 595.121

И.А. Кутырев [1], Н.М. Бисерова [2], Й.П. Шарсак [3], Й. Курц [3]

ПРОСТАГЛАНДИН E_2 КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИММУНОМОДУЛЯТОР ЛЕНТЕЦА ЧАЕЧНОГО

[1] Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (Улан-Удэ)
[2] Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (Москва)
[3] Университет г. Мюнстера, Институт эволюции биоразнообразия, Группа эволюционной экологии животных (Мюнстер, Германия)

Работа посвящена исследованию простагландина E_2 как потенциального иммуномодулятора лентеца чаечного, представляющего важное эпизоотическое и эпидемиологическое значение в озере Байкал и его бассейне. Методом конфокальной микроскопии выявлено, что в организме лентеца чаечного простагландин E_2 продуцируется и секретируется наружу специализированными фронтальными железами. Методом культуры лейкоцитов головного отдела почки исследовано влияние простагландина E_2 на иммунологические реакции рыб (на примере трехиглой колюшки). Выявлено, что данный иммуномодулятор снижает абсолютное содержание лейкоцитов и относительное число лимфоцитов. Несмотря на общее снижение респираторного взрыва лейкоцитов, респираторный взрыв в пересчете на 1 гранулоцит, остается неизменным.

Ключевые слова: *простагландин E_2, иммуномодулятор, цестоды*

PROSTAGLANDIN E_2 AS GULL TAPEWORM POTENTIAL IMMUNOMODULATOR

I.A. Kutyrev [1], N.M. Biserova [2], J.P. Scharsack [3], J. Kurtz [3]

[1] Institute of General and Experimental Biology SB RAMS, Ulan-Ude
[2] Biological Faculty, Lomonosov's Moscow State University, Moscow
[3] Animal Evolutionary Ecology Group, Institute for Evolution and Biodiversity, University of Münster, Münster, Germany

This article is devoted to investigation of prostaglandin E_2 as potential immunomodulator of gull tapeworm. This parasite has an important epizootic and epidemiological significance in the Lake Baikal and its basin. Using confocal microscopy, it was revealed that prostaglandin E_2 is produced and secreted with specialized frontal glands in the organism of gull tapeworm. Using the method of leukocyte culture, the influence of prostaglandin E_2 on immunological reaction of fishes was investigated (by way of example of three-spined stickleback). This immunomodulator decreased the absolute number of leucocytes and percentage of lymphocytes. Despite of total leukocyte respiratory-burst activity decreasing, respiratory-burst activity per 1 granulocyte remains constant.

Key words: *prostaglandin E_2, immunomodulator, cestodes*

Коэволюция паразитов и их хозяев протекает динамично и стремительно. Благодаря своей высокой приспособительной способности и быстрому эволюционированию, паразиты распространены повсеместно. Способность паразитических червей регулировать иммунный ответ позволяет им существовать в организме хозяина длительное время. К настоящему времени изучен широкий спектр веществ, выделяемых гельминтами млекопитающих, которые играют роль иммунорегуляторов в организме хозяина [1, 2]. Иммунорегуляторные молекулы паразитов рыб остаются на сегодняшний день неизученными. Простагландины (PG) представляют собой группу синтезируемых паразитами структурно взаимосвязанных биоактивных липидных медиаторов, вовлеченных в развитие разнообразных симптомов, сопровождающих паразитозы. Одним из наиболее распространенных цестодозов в бассейне озера Байкал является дифиллоботриоз, вызываемый лентецом чаечным *Diphyllobothrium dendriticum*Nitsch., 1824. На фазе плероцеркоида он выступает доминантным паразитом лососевидных рыб подотряда Salmonoidei, а зараженность байкальского омуля *D. dendriticum* достигает 70 – 100 % [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Криотомные срезы плероцеркоидов *D. dendriticum* (8 – 10 мкм) в течение суток при температуре 4 °С инкубировали с моноклональными антителами против PG E_2 и α-тубулина (SIGMA, США), затем инкубировали во вторичных антителах, конъюгированных с флуорохромами, в течение 2 ч при температуре 4 °С. Срезы исследовали при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TSC SPE (Германия).

Для исследования влияния простагландина E_2 на иммунную систему рыб была использована культура лейкоцитов головного отдела почки трехиглых колюшек [4, 5]. В работе были использованы 22 особи рыб. Исследования проводились в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных приказом МЗ СССР. Умерщвление животных осуществляли путем декапитации. В качестве позитивного контроля использовали липополисахариды (LPS). Кроме того, экстракт *S. solidus* (SS) был использован для стимуляции лейкоцитов в сочетании с простагландином E_2. Культура клеток инкубировалась в CO_2-инкубаторе с водяной рубашкой Thermo Scientific в течение

4 суток. Респираторный взрыв оценивался при помощи хемилюминометра Tecan. Соотношение субпопуляций лейкоцитов – лимфоцитов и гранулоцитов анализировали при помощи проточного цитофлюориметра FACS Canto.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Интенсивная PG E_2-like-иммунореакция (ИР) выявлена в крупных клетках, расположенных в зоне кортикальной паренхимы и субтегумента. (рис. 1а, в). При двойном окрашивании срезов антителами к PG E_2 в сочетании с антителами к α-тубулину были выявлены участки наложения иммунореактивности в тегументальной, субтегументальной областях и паренхиме (рис. 1б, г). PG E_2-like-иммунореактивные участки расположены внутри α-тубулин-иммунореактивных участков и занимают меньшую, по сравнению с ними, площадь.

До сих пор неизвестно, какие клеточные элементы продуцируют иммуномодуляторные молекулы цестод. Впервые выявленные у *D. dendriticum* PG E_2-like-иммунореактивные структуры свидетельствуют о наличии специализированных клеток, выделяющих простагландин E_2 на поверхность тегумента, в ткани хозяина.

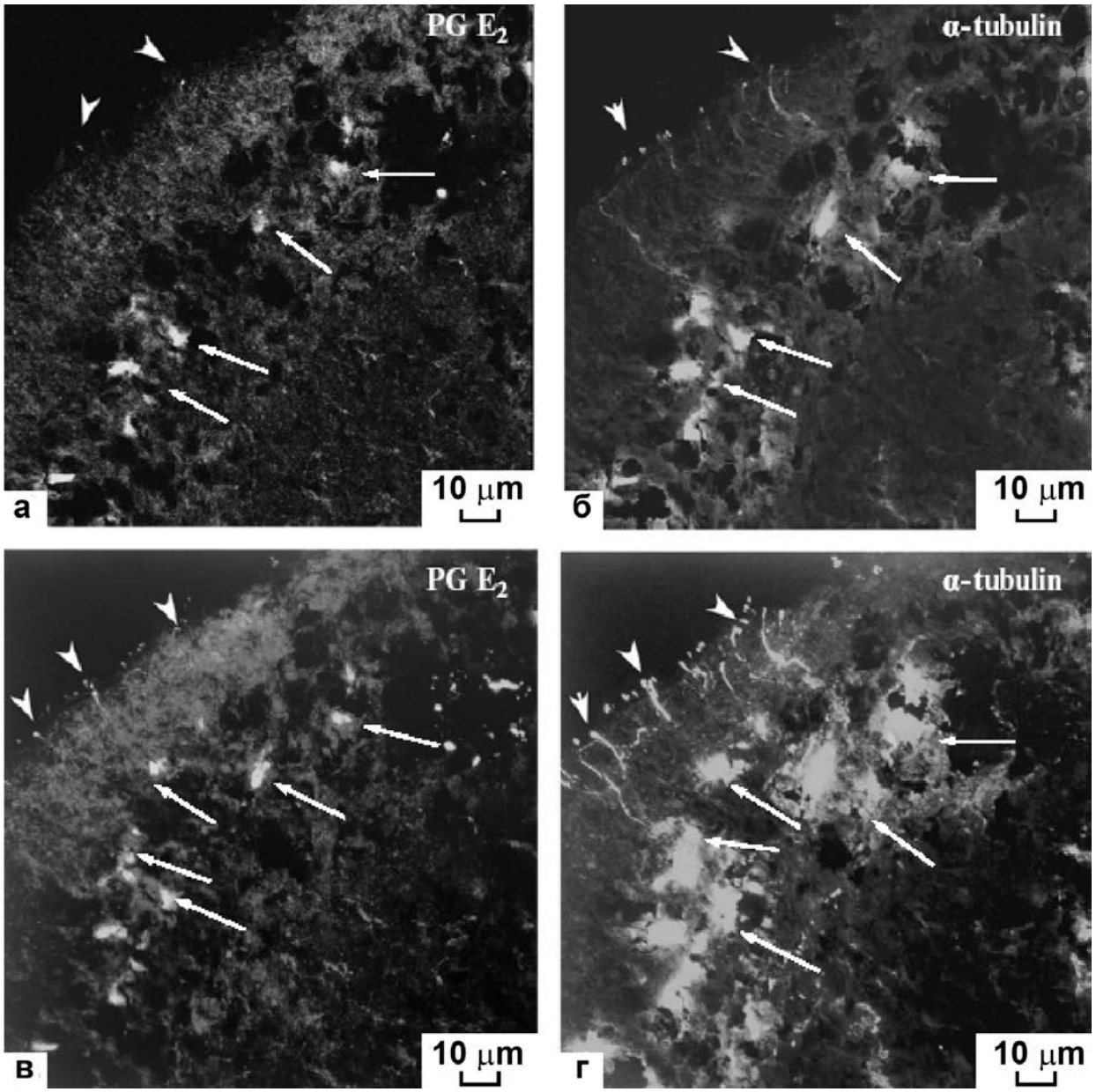

Рис. 1. Иммунореактивность к простагландину E_2 и ацетилированному тубулину в тегументе и паренхиме плероцеркоида *D. dendriticum*. Поперечные срезы, двойное окрашивание. **а** – PG E_2-like-иммунореактивные структуры в тегументе (короткие фигурные стрелки) и кортикальной паренхиме (длинные стрелки); **б** – α-тубулин-иммунореакция в той же области, конфокальная пара с **а**. Показаны иммунореактивные к тубулину клетки (длинные стрелки) с отростками, направленными в тегумент, а также каплевидные структуры на поверхности тегумента (короткие фигурные стрелки); **в** – PG E_2-like-иммунореактивные структуры в тегументе (короткие фигурные стрелки) и кортикальной паренхиме (длинные стрелки); **г** – α-тубулин-иммунореакция в той же области, конфокальная пара с в. Обозначения, как на рис. 1б.

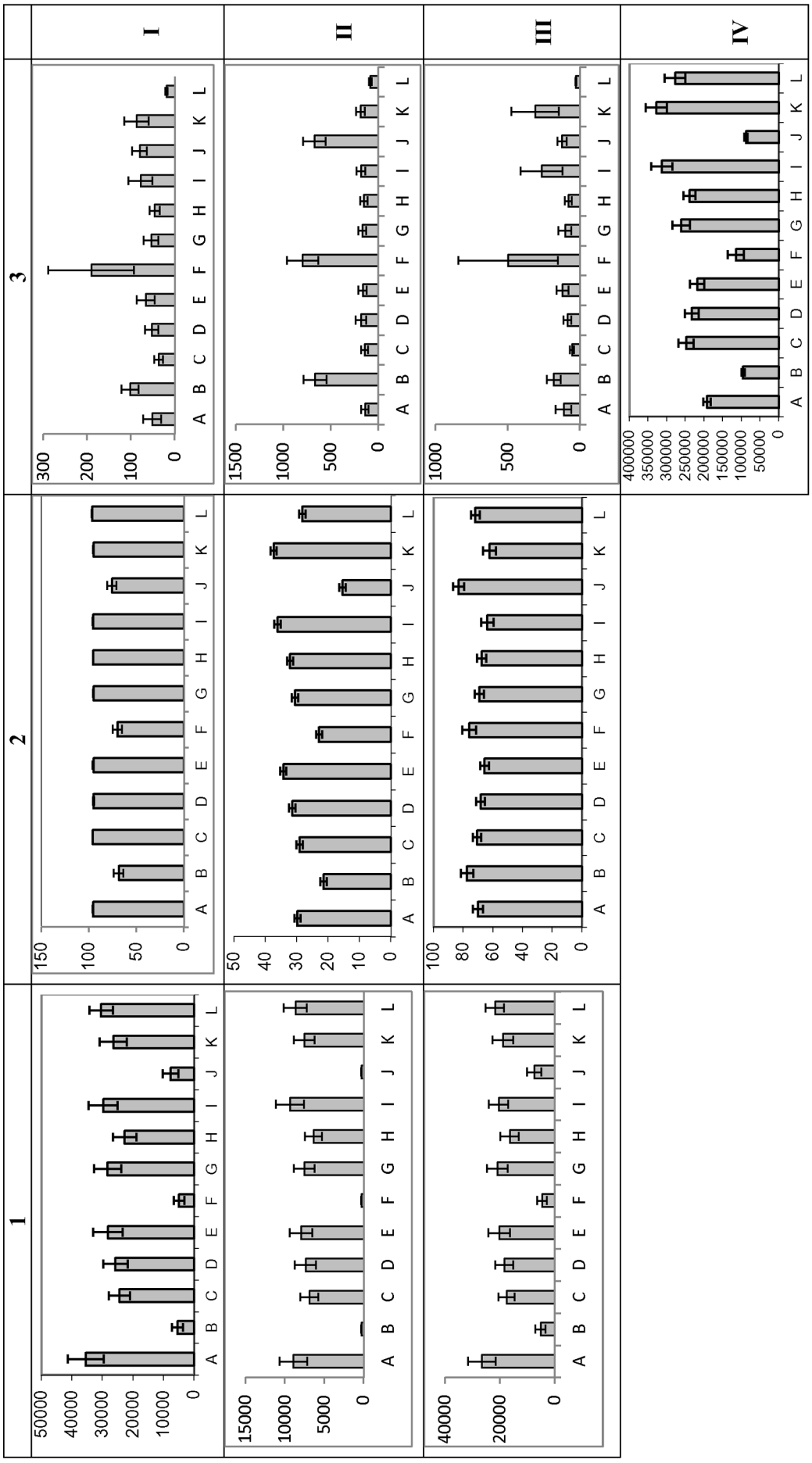

Рис. 2. Изменения характеристик лейкоцитов головного отдела почки трехиглой колюшки при воздействии PGE_2 (X = M ± SE). Характеристики измерены после 4 дней культивирования лейкоцитов. **1** – абсолютное число клеток, **2** – процентное содержание клеток, **3** – респираторный взрыв клеток. **1-I**, **2-I** – лейкоциты. **3-I** – респираторный взрыв в пересчете на 1 лейкоцит. **1-II**, **2-II** – лимфоциты. **3-II** – респираторный взрыв в пересчете на 1 лимфоцит. **1-III**, **2-III** – гранулоциты. **3-III** – респираторный взрыв в пересчете на 1 гранулоцит. **IV** – общий респираторный взрыв. A – Контрольная культура клеток, B – 10^{-4} $MPGE_2$, C – $10^{-7}$$MPGE_2$, D – $10^{-10}$$MPGE_2$, E – экстракт *Shistocephalussolidus* (SS), F – $10^{-4}$$MPGE_2$ + SS, G – $10^{-7}$$MPGE_2$ + SS, H – $10^{-10}$$MPGE_2$ + SS, I – липополисахариды (LPS), J – $10^{-4}$$MPGE_2$ + LPS, K – $10^{-7}$$MPGE_2$ + LPS, L – $10^{-10}$$MPGE_2$ + LPS.

Наложение зон иммунореактивности к PG E_2 и α-тубулину свидетельствует о принадлежности иммунореактивных элементов к железистым или нервным клеткам, имеющим укрепленные микротрубочками протоки или отростки и поэтому специфически взаимодействующим с антителами к тубулину. По расположению и ряду морфологических особенностей (форма перикариона, наличие длинных отростков, пронизывающих тегумент, формирование расширений в зоне тегумента, каплевидные структуры на поверхности тела), PG E_2-like-и α-тубулин-иммунореактивные элементы соответствуют железам, выносящим секрет на поверхность тегумента через собственные специализированные протоки. Такие железы присутствуют на всех стадиях онтогенеза дифиллоботриид и относятся к типу фронтальных желез [6]. Они обладают самостоятельными секреторными протоками, армированными субмембранным слоем микротрубочек. Их концевые отделы отграничены от цитоплазмы тегумента мембранами и специализированными контактами, выбрасывая секрет наружу под контролем нервной системы [7]. Ультраструктура желез изучена у некоторых дифиллоботриид, но их функциональная роль неизвестна: им приписывалась адгезивная функция или роль желез проникновения с выделением лизирующего секрета [8].

PG E_2 оказывает наибольший эффект на лейкоциты при максимальной концентрации (10^{-4} M) как самостоятельно, так и в сочетании с SS и LPS (рис. 2). Он снижает как общее содержание лейкоцитов, так и отдельных субпопуляций. Однако снижение абсолютного числа лимфоцитов более выражено, по сравнению с гранулоцитами. Поэтому процентное содержание гранулоцитов достоверно не изменяется при концентрации 10^{-4} M PG E_2 и возрастает под воздействием 10^{-4} M P GE_2 в сочетании с SS и LPS, в противоположность лимфоцитам, процентное содержание которых снижается под воздействием 10^{-4} M PG E_2.

Общий респираторный взрыв снижается под влиянием 10^{-4} M PG E_2 как в отдельности, так и в сочетании с SS и LPS. В то же время, под воздействием 10^{-4} M PG E_2,респираторный взрыв в пересчете на 1 лейкоцит, в частности, на 1 гранулоцит, достоверно не изменяется. В противоположность, респираторный взрыв в пересчете на 1 лимфоцит увеличивается в этом случае. При сочетании 10^{-4} M PG E_2 с SSи LPS, респираторный взрыв значительно усиливается в пересчете как на 1 лимфоцит, так и 1 гранулоцит.

Поскольку лейкоциты инкубировались в течение 4 суток с вышеуказанными реагентами, можно предположить, что клетки адаптировались к их иммуномодулирующему воздействию. Респираторный взрыв — один из наиболее важных эффекторных механизмов клеточного врожденного иммунитета. Гранулоциты реализуют эту функцию. Нашими исследованиями показано, что, хотя снижается абсолютное и относительное количество лейкоцитов, процентное содержание гранулоцитов остается неизменным. Таким образом, лейкоциты сохраняют на одном уровне процентное содержание гранулоцитов на фоне снижения процентного содержания самих лейкоцитов. Кроме того, не изменяется респираторный взрыв в пересчете на 1 гранулоцит. Общий респираторный взрыв снижается только благодаря снижению абсолютного числа лейкоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящим исследованием впервые показано, что цестоды, на примере *D. dendriticum*, могут продуцировать и секретировать PG E_2, используя специализированные фронтальные железы. Впервые показано влияние PG E_2 на культуру лейкоцитов рыб. Таким образом, исследованное вещество может являться иммуномодулятором цестод. PG E_2в культуре лейкоцитов обладает эффектом, не сходным с экстрактом *S. solidus*. Однако, с другой стороны, данный экстракт — смесь различных биологически активных веществ. В связи с этим, необходимы дальнейшие более подробные исследования биохимического состава цестод, паразитирующих в рыбах.

Авторы выражают благодарность Н.М. Пронину, Т.Г. Бурдуковской (ИОЭБ СО РАН), А.В. Молчанову (РГУ ветеринарии «Бурятская республиканская станция по борьбе с болезнями животных»), Е. Цитрину (ИБР РАН) за помощь в сборе материала и техническую поддержку.

Работа выполнена по проекту СО РАН VI.43.1при финансовой поддержке грантов ОПТЭК (2012 год), РФФИ № 12-04-98002, Германской службы академических обменов (ДААД, № А/11/04242).

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов В.Г., Бисерова Н.М. Морфология двух типов фронтальных желез *Grillotiaerinaceus* (Cestoda:Trypanorhyncha) // Паразитология. — 1985. — Т. 19, № 1. — С. 32—37.

2. Куперман Б.И. Функциональная морфология низших цестод. — Л.: Наука, 1988. — 167 с.

3. Русинек О.Т. Паразиты рыб озера Байкал (фауна, сообщества, зоогеография, история формирования). — М.: КМК, 2007. — 600 с.

4. Andersen K.I. Ultrastructural Studies on *Diphyllobothrium ditremum* and *D. dendriticum* (Cestoda, Pseudophyllidea) // Parasitol. Res. — 1975. — Vol. 46. — P. 253—264.

5. Habitat specific adaptation of immune responses of stickleback (*Gasterosteusaculeatus*) lake and river ecotypes / J.P. Scharsack [et al.] // Proc. R. Soc. Lond. — 2007. — Vol. 274. — P. 1523—1532.

6. Hewitson J.P., Grainger J.R., Maizels R.M. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity // Mol. Biochem. Parasit. — 2009. — P. 1—11.

7. Modulation of the host's immune response by schistosome larvae / S.J. Jenkins [et al.] // Parasite Immunol. — 2005. — Vol. 27. — P. 385—393.

8. Scharsack J.P., Koch K., Hammerschmidt K. Who is in control of the stickleback immune system: interactions between *Schistocephalus solidus* and its specific vertebrate host // Proc. R. Soc. Lond. — 2007. — Vol. 274. — P. 3151—3158.

Сведения об авторах

Кутырев Иван Александрович – к.б.н., младший научный сотрудник Института общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, Улан-Удэ, ул. Сахяновой, 6, Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, р.т. (3012) 434229)
Бисерова Наталья Михайловна – д.б.н., старший научный сотрудник биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (119991, Москва, Воробьевы горы, 1, Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова)
Шарсак Йорн – к.б.н., научный сотрудник Университета г. Мюнстера, Институт эволюции биоразнообразия, Группа эволюционной экологии животных (D-48149, Германия, г. Мюнстер, Хюфферштрассе, 1, Университет г. Мюнстера, Институт эволюции биоразнообразия, Группа эволюционной экологии животных)
Курц Йоахим – д.б.н. профессор, заведующий группой (D-48149, Германия, г. Мюнстер, Хюфферштрассе, 1)