

Сергеева О. М., 1991. Распределение фитопланктона в бассейне Белого моря в июле 1972 г. и в августе 1973 // В сб.: Исследования фитопланктона в системе мониторинга Балтийского моря и других морей. М: отд. Гидрометеоздата.

Halsband-Lenk C., 2005. *Metridia pacifica* in Dabob Bay, Washington: the diatom effect and the discrepancy between high abundance and low egg production rates // Progress in Oceanography. V. 67. P. 422–441.

Utermohl H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik // Mitteilungen der Internationalen Vereinigung fur Limnologie, V. 9. P. 1–38.

РОЛЬ NF- κ B И МАРК В АКТИВАЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ARC3-LIKE В ГЕПАТОПАНКРЕАСЕ МОРСКОЙ ЗВЕЗДЫ *ASTERIAS RUBENS* ПРИ ДЕЙСТВИИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

Д.А. Могиленко^{1,2}, Д.А. Сафина¹, И.В. Кудрявцев^{1,2}

¹ ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, г. Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург
e-mail: igorek1981@yandex.ru

Введение

Компонент комплемента С3 играет важную роль в защитных реакциях и в реализации разнообразных механизмов врожденного и приобретенного иммунитета у животных. Одной из наиболее существенных функций С3 является участие в активации системы комплемента (Walport, 2001). В последнее время появляются данные об участии С3 в различных процессах приобретенного иммунитета, таких как процессинг антигена (Villiers et al., 2008), регуляции дифференцировки и созревания дендритных клеток (Reis et al., 2008), а также развития В-клеток памяти и регуляторных Т-лимфоцитов (Ghannam et al., 2008). У позвоночных синтез и экспрессия С3 происходит главным образом в печени (Alper et al., 1969), однако в очаге воспаления эту способность приобретают и макрофаги (Colten et al., 1986). У беспозвоночных животных экспрессия С3 найдена в циркулирующих клетках: гемоцитах у асцидий (Nonaka et al., 1999) и целомоцитах у морских ежей (Al-Sharif et al., 1998). Было показано, что у беспозвоночных вторичноротых С3 действует как опсонин, усиливая способность макрофагоподобных клеток к фагоцитозу бактериального патогена (Clow et al., 2004). Интересно, что у морского ежа уровень экспрессии гена, кодирующего гомолог С3, возрастает в ответ на действие бактериального липополисахарида (Clow et al., 2000). Несмотря на это, сигнальные пути, регулирующие экспрессию гена С3 при действии ЛПС, все еще плохо изучены, как у позвоночных, так и у беспозвоночных животных.

В ходе предварительных исследований у морской звезды *Asterias rubens* фрагмент гена, гомологичного компоненту комплемента С3. Филогенетический анализ этого гена, названного ArC3-like, показал его близкое родство с генами гомологов С3 вторичноротых беспозвоночных животных. Мы обнаружили высокий уровень экспрессии гена ArC3-like в циркулирующих клетках (целомоцитах), дериватах кишки (гепатопанкреас) и в мужской гонаде у морской звезды. Мы также показали, что введение в целомическую полость морской звезды раствора бактериального ЛПС приводило к усилению экспрессии гена ArC3-like в целомоцитах и гепатопанкреас по сравнению с контрольным введением стерильной морской воды.

Целью этой работы являлось изучение NF- κ B и МАРК сигнальных путей в процессе активации экспрессии гена ArC3-like в гепатопанкреасе морской звезды *Asterias rubens* в ответ на действие бактериального ЛПС.

Материалы и методы

Сбор экспериментальных животных *Asterias rubens* (Echinodermata: класс *Asteroidea*, отряд *Forcipulata*) производили в июне-августе 2008 г. на базе Беломорской Биологической Станции им. акад. О.А.Скарлато ЗИН РАН. Для экспериментов использовали морских звезд с длиной луча 10±2 см. Печеночные выросты (гепатопанкреас) получали сразу после диссекции морской звезды и перфузировали стерильной морской водой (СМВ). Далее гепатопанкреас инкубировали 48 ч в полной культуральной среде на основе среды RPMI-1640 с добавлением NaCl (до 24 ‰), 10 % стерильной пулиро-

ванной сыворотки интактных морских звезд *A. rubens*, 10 mM HEPES, 2 mM L-глутамина и 80 мкг/мл гентамицина. После чего трижды отмывали СМВ и переводили в свежую среду RPMI-1640.

Ингибиторы сигнальных киназ

Ингибиторы MAP киназ были получены из Biomol: SB203580 (ингибитор p38 MAP); JNKinH II (ингибитор JNK1/2/3); U0126 (ингибитор MEK1/2). Ингибитор активации NF-κB (QNZ) был получен из Tebu-bio. Раствор ЛПС из *Salmonella typhimurium* готовили *ex tempera* раствор ЛПС на СМВ. Ингибиторы добавляли за 1 ч до добавления ЛПС (50 мкг/мл), после чего гепатопанкреас инкубировали 24 ч.

Выделение тотальной РНК и реакция обратной транскрипции

Тотальную РНК из гепатопанкреаса морской звезды выделяли, используя реагент STAT-60 («TEL-TEST») в соответствии с инструкциями изготовителя. Перед проведением реакции обратной транскрипции РНК обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКазы («Roche Applied Science»). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием олиго-dT праймера (T18) и обратной транскриптазы M-MuLV производства «Invitrogene» в соответствии с инструкциями изготовителя. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали по 5 мкг тотальной РНК.

Ретро-ПЦР-анализ (RT-PCR) и количественный ретро-ПЦР-анализ (qRT-PCR)

Праймеры для ПЦР подбирали с использованием программы «Primer», разработанной В. Прутковским и О. Сокур (Институт Гриппа, РАМН). В работе были использованы праймеры, подобранные нами к кДНК гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH) морской звезды (5'-ATTGCTGAGGGGTGATGAC-3' и 5'-CTGGAACACGAAAAGCCATT-3') и праймеры кДНК гена морской звезды ArC3-like (5'-TTCCTTGGCTCTCAACGTCT-3' и 5'-TGCAAAAACAGCAAATGAGC-3'). qRT-PCR проводили при помощи анализатора нуклеиновых кислот АНК-32 (Институт Аналитического Приборостроения РАН), используя технологию SyberGreen по следующей схеме: 3 мин 95°C, затем 45 циклов, включающих 30 с 95°C, 20 с 60°C и 30 с 72°C. Рассчитанные количества кДНК каждого из генов нормировали по уровню экспрессии гена «домашнего хозяйства», (GAPDH), и представляли как относительный уровень экспрессии гена, принимая за 100% уровень экспрессии в контрольных клетках.

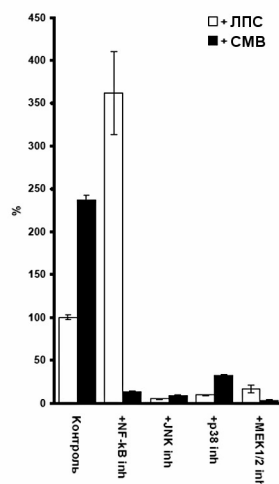
Результаты исследования

Бактериальный ЛПС увеличивает уровень мРНК ArC3-like в гепатопанкреасе морской звезды *in vivo*.

Введение раствора ЛПС в целомическую полость морской звезды (с концентрацией в целомической жидкости 50–100 мкг/мл) приводило к увеличению уровня экспрессии гена ArC3-like в печеночных выростах, через 24 ч. Введение СМВ не влияло на уровень экспрессии гена ArC3-like в печеночных выростах. Изучение временной динамики экспрессии гена ArC3-like в печеночных выростах при действии ЛПС показало увеличение уровня экспрессии этого гена через 6 ч, которое достигало максимума через 12–24 ч после воздействия ЛПС в печеночных выростах. Экспрессия гена ArC3-like оставалась повышенной по сравнению с базальным уровнем даже после 48 ч с момента введения ЛПС, но снижалась относительно уровня экспрессии через 24 ч после воздействия ЛПС. В ответ на введение животным СМВ уровень экспрессии гена ArC3-like не изменялся в печеночных во временном интервале 1 – 48 ч.

Ингибирование сигнальных путей NF-κB и MEK1/2 приводит к отмене ЛПС-зависимой активации экспрессии гена ArC3-like в гепатопанкреасе морской звезды *in vitro*.

Для определения сигнальных путей, вовлеченных в ЛПС-зависимое усиление экспрессии гена ArC3-like в печеночных выростах морской звезды, мы использовали химические ингибиторы NF-κB, JNK, p38 MAP и MEK1/2. Добавление ЛПС к печеночным выростам морской звезды *in vitro* приводило к увеличению уровня мРНК ArC3-like в $2,37 \pm 0,06$ раза по сравнению с контрольным добавлением СМВ (рис. 1). Добавление ингибитора NF-κB приводит к активации уровня экспрессии гена ArC3-like примерно в 3,5 раза и отменяет эффект ЛПС-зависимой активации экспрессии гена ArC3-like. Ингибирование JNK, p38 MAP и MEK1/2 приводит к уменьшению экспрессии гена ArC3-like на $94,2 \pm 0,3\%$, $90,2 \pm 0,6\%$ и $83,0 \pm 4,5\%$, соответственно (рис. 1). Однако к отмене ЛПС-зависимой активации экспрессии гена ArC3-like приводило только ингибирование MEK1/2, в то время как добавление ингибитора JNK приводило только к частичной отмене усиления экспрессии гена ArC3-like при действии ЛПС. Добавление ингибитора p38 MAP не уменьшало степень активации экспрессии гена ArC3-like при действии ЛПС (рис.).



Роль NF-κB, JNK, p38 MAP и MEK1/2 в ЛПС-зависимой активации экспрессии гена ArC3-like в гепатопанкреасе морской звезды *in vitro*. NF-κB inh – QNZ (40nM, ингибитор активации NF-κB), p38 inh – SB203580 (50 мкМ, ингибитор p38 MAP); JNK inh – JNKin II (20 мкМ, ингибитор JNK1/2/3); MEK1/2 inh – U0126 (20мкМ, ингибитор MEK1/2). Ингибиторы добавляли за 1 ч до добавления ЛПС из *Salmonella typhimurium* (50 мкг/мл) или равного объема СМВ, после чего гепатопанкреас инкубировали 24 ч. Уровни экспрессии гена ArC3-like определяли методом количественной RT-PCR. Результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего

Обсуждение результатов

В этой работе мы показали ЛПС-зависимую активацию экспрессии гена, гомологичного C3 (ArC3-like), в печеночных выростах у морской звезды *Asterias rubens*. В печеночных выростах уровень экспрессии гена ArC3-like возрастает уже через 6 ч и остается повышенным по сравнению с базальным уровнем даже через 24–48 ч с момента введения бактериального ЛПС. Известно, что ЛПС действует на TLR позвоночных и беспозвоночных животных, приводя к NF-κB и MAPK-зависимой активации экспрессии генов провоспалительных факторов и генов острой фазы иммунного ответа. Известно, что в геноме морского ежа *S.purpuratus*, филогенетически близкородственного морской звезде, содержится 222 гена, потенциально кодирующих толл-подобные белки (TLR), в результате экспрессии которых может образоваться как минимум 350 белковых продуктов, что, по мнению авторов, может свидетельствовать о наличии у иглокожих неких механизмов, позволяющих увеличить спектр распознаваемых патогенов (Pancer, Cooper, 2006). Однако механизмы диверсификации этой группы Toll-подобных белков пока не изучены. Подобного рода способы увеличения спектра распознаваемых лигандов описаны и для других групп беспозвоночных и позвоночных животных, причем в качестве распознаваемых молекул используются как белки, обогащенные лейцин-богатыми повторами, так и белки, несущие иммуноглобулиновые молекулы (Pancer, Cooper, 2006). Кроме того, в геноме иглокожих присутствуют гомологи генов транскрипционных факторов сигнального пути NF-κB (Hibino et al., 2006). Ингибирование NF-κB отменяет эффект ЛПС-зависимой активации экспрессии гена ArC3-like у морской звезды (рис. 1), что, по-видимому, указывает на участие NF-κB в передаче активаторного сигнала от ЛПС на экспрессию гена ArC3-like в клетках печеночных выростов. Уменьшение экспрессии гена ArC3-like при добавлении ингибиторов JNK, p38 MAP и MEK1/2 может свидетельствовать о положительном вкладе MAPK сигнального пути в регуляцию экспрессии гена ArC3-like у морской звезды (рис. 1). Интересно, что к отмене ЛПС-зависимой активации экспрессии гена ArC3-like приводило только ингибирование MEK1/2, но не JNK, p38 MAP (рис. 1). Полученные нами данные указывают, что активация экспрессии гена ArC3-like в печеночных выростах у морской звезды при действии бактериального ЛПС опосредованно активацией NF-κB и MEK1/2 сигнальных путей. Работа поддержана грантом РФФИ № 08-04-00111.

Литература

Alper C.A., Johnson A.M., Birtch A.G., Moore F.D., 1969. Human C3: evidence for the liver as the primary site of synthesis // Science. V. 163. P. 286–288.

- Al-Sharif W.Z., Sunyer J.O., Lambris J.D., Smith L.C., 1998. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3 // *J. Immunol.* V. 160. P. 2983–2997.
- Clow L.A., Gross P.S., Shih C., Smith L.C., 2000. Expression of SpC3, the sea urchin complement component, in response to lipopolysaccharide // *Immunogenetics.* V. 51. P. 1021–1033.
- Clow L.A., Raftos D.A., Gross P.S., Smith L.C., 2004 The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as an opsonin // *J. Exp. Biol.* V. 207 (12). P. 2147–2155.
- Colten H.R., Strunk R.C., Perlmutter D., Cole F.S., 1986. Regulation of complement protein biosynthesis in mononuclear phagocytes // *Ciba Found Symp.* V. 118. P. 141–154.
- Ghannam A., Pernollet M., Fauquert J.L., Monnier N., Ponard D., Villiers M.B., Péguet-Navarro J., Tridon A., Lunardi J., Gerlier D., Drouet C., 2008. Human C3 deficiency associated with impairments in dendritic cell differentiation, memory B cells, and regulatory T cells // *J. Immunol.* V. 181 (7). P. 5158–5166.
- Hibino T., Loza-Coll M., Messier C., Majeske A.J., Cohen A.H., Terwilliger D.P., Buckley K.M., Brockton V., Nair S.V., Berney K., Fugmann S.D., Anderson M.K., Pancer Z., Cameron R.A., Smith L.C., Rast J.P., 2006. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome // *Dev. Biol.* V. 300. P. 349–365.
- Nonaka M., Azumi K., Ji X., Namikawa-Yamada C., Sasaki M., Saiga H., Dodds A.W., Sekine H., Homma M.K., Matsushita M., Endo Y., Fujita T., 1999. Opsonic complement component C3 in the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi* // *J. Immunol.* V. 162. P. 387–391.
- Pancer Z., Cooper M.D., 2006. The evolution of adaptive immunity // *Annu. Rev. Immunol.* V. 24. P. 497–518.
- Reis E.S., Barbuto J.A., Köhl J., Isaac L., 2008. Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3 // *Mol. Immunol.* V. 45 (7). P. 1952–1962.
- Villiers C.L., Cretin F., Lefebvre N., Marche P.N., Villiers M.B., 2008. A new role for complement C3: regulation of antigen processing through an inhibitory activity // *Mol. Immunol.* V. 45 (13). P. 3509–3516.
- Walport M.J., 2001. Advances in immunology: complement (first of two part) // *N. Engl. J. Med.* V. 344. P. 1058–1066.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ И ЖАБР ЛЕЩА (*ABRAMIS BRAMA L.*) ИЗ РЫБИНСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА В КАЧЕСТВЕ БИОИНДИКАТОРА ЗАГРЯЗНЕНИЯ СРЕДЫ ПОЛИХЛОРИРОВАННЫМИ БИФЕНИЛАМИ

А.А. Морозов¹, Г.М. Чуйко¹, Е.С. Бродский²

¹Учреждение Российской академии наук Институт биологии внутренних вод
им. И.Д. Папанина РАН, пос. Борок Ярославской обл., Россия

²Учреждение Российской академии наук Институт проблем экологии и эволюции
им. А.Н. Северцова РАН, г. Москва
e-mail: morozov@ibiw.yaroslavl.ru

Введение

Одной из приоритетных групп загрязнителей водной среды являются полихлорированные бифенилы (ПХБ). Они способны аккумулироваться в тканях рыб, находиться в них длительное время и изменять ход важнейших процессов жизнедеятельности. В то же время, рыба, являясь одним из последних звеньев в пищевых цепях водных биоценозов, обладает способностью концентрировать многие токсические метаболиты, представляет собой угрозу здоровью человека при ее потреблении в пищу.

При мониторинге водных экосистем необходим индивидуальный анализ химических компонентов не только в окружающей среде, но также в тканях животных и растений. Это объясняет возрастающий интерес к изучению реакции обитателей экосистем на антропогенное воздействие. Интегральная оценка здоровья рыб может служить обобщенным показателем состояния всего водного сообщества, в том числе экологического благополучия или неблагополучия водоема. При этом необходимо проводить исследования на различных уровнях организации живых систем. Изменения на молекулярном и мембранном уровнях могут служить сигналом к далеко идущим последствиям для данного вида организмов задолго до того, как наступят необратимые изменения в численности, биологической продуктивности, ареале распространения вида и т.п.

За последние десятилетия накопился обширный материал о реакции рыб на химическое загрязнение. Растущий уровень антропогенного воздействия на природные популяции рыб остро ставит проблему их адаптивных возможностей. В этой связи особую важность представляет изучение наиболее чувствительных и быстро реагирующих систем организма. В число последних входит сис-