

Степанов М.В., Кияшко В.И., 2000. Роль тюльки (*Clupeonella cultriventris* (Nordmann)) в питании хищных рыб Рыбинского водохранилища // Биология внутренних вод. № 4. С. 86–89.

Стрельникова А.П., Столбунов И.А., 2001. Распределение и плотность молоди рыб на мелководьях Рыбинского водохранилища // Экологические проблемы Верхней Волги. Ярославль. С. 171–179.

Тютин А.В., Слынько Ю.И., Медянцева Е.Н., 2007. Бычок-цуцик *Proterorhinus marmoratus* (Gobiidae, Pisces) – новый переносчик паразитических инфузорий в бассейне Верхней Волги // Ихтиологические исследования на внутренних водоемах: Материалы международной научной конференции. Саранск: Мордовский гос. ун-т. С. 173–175.

Hughes Jeffrey E., Deegan Linda A., Weaver Melissa J., Cocta Joseph E., 2002. Regional application of an index of estuarine biotic integrity based on fish communities // Estuaries. 25. N 2. P. 250–263.

Mikheev V.N., 2000. Foraging behavior of fishes and habitat complexity: searching prey selection and conflict of motivations // Journal of Ichthyology. V. 40. Suppl. 2. P. 262–270.

Okun Nils, Mehner Thomas., 2003. Reed as an alternative habitat for young fishina shallow entrophic lake // Int/ Ver/ Theor. and angew. Limnol. 28. Pt. 4. P. 1669–1672.

## STRUCTURAL ORGANIZATION OF FORAGING ASSEMBLAGES OF FISH JUVENILES IN THE LITTORAL OF THE RYBINSK RESERVOIR

A.P. Strelnikova, A.S. Strelnikov

Papanin Institute for biology of inland waters of the Russian academy of sciences, Borok, Yaroslavl reg., Russia  
e-mail: strela@ibiw.yaroslavl.ru

Specific, spatial, size-age and trophic structure of juvenile fish aggregations in the littoral zone of the Rybinsk reservoir was studied. It was shown that certain dissociation in the terms of fish larvae appearance in the waterbody, their habitation in different microbiotopes and aggregation structure decreases the probability of intense food relations in juveniles of closely related species. Functional role of littoral phytocenoses in the complex system of living organisms' interrelations inhabiting the zone of macrophyte beds was elucidated. Classic way of organic matter transformation in water ecosystems phytoplankton-nonpredatory invertebrates-fish is supplemented by two more directions in the littoral biotopes overgrown with macrophytes: phytoperiphyton-nonpredatory invertebrates-fish and vegetable detritus-nonpredatory invertebrates-fish.

## ВЛИЯНИЕ ЛЕКТИНОВ РАЗЛИЧНОЙ УГЛЕВОДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ НА ГЕМОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЕМОЦИТОВ МИДИИ *MYTILUS EDULIS*

А.Н. Сухачев<sup>1,2</sup>, И.В. Кудрявцев<sup>1,2</sup>, К.Е. Николаев<sup>3</sup>, К.В. Галактионов<sup>3</sup>,  
А.Д. Харазова<sup>2</sup>, А.В. Полевщиков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет, г. Санкт-Петербург,

<sup>3</sup> Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

e-mail: ovechka21@yandex.ru

Распознавание углеводных детерминант на поверхности патогена играет важную роль в системе защитных реакций врожденного иммунитета различных групп животных. В настоящее время углевод-распознающие рецепторы, равно как и сквенджер- и толл-подобные рецепторы, относятся к группе паттерн-распознающих молекул, которые связываются со специфическими молекулярными паттернами (известными как ассоциированные с патогенами молекулярные паттерны или ПАМП) определенных микроорганизмов. Результатом подобного рода взаимодействий является активация клеточных и гуморальных эффекторных систем, направленных на элиминацию патогена из внутренней среды организма. У беспозвоночных основная функциональная нагрузка по распознаванию и уничтожению патогена приходится на циркулирующие клетки гемолимфы – гемоциты. Гемоциты различных представителей моллюсков несут на своей поверхности широкий спектр углевод-распознающих рецепторов, которые играют ведущую роль в распознавании микроорганизмов и многоклеточных паразитов (Castillo, Yoshino, 2002). Взаимодействие рецепторов со специфическими лигандами приводит к активации циркулирующих клеток, их направленной миграции в место

проникновения патогена и запуску процесса фагоцитоза. В результате происходит уничтожение  $\gamma$  посредством кислород зависимых и кислород независимых механизмов. Если углевод-связывающие молекулы имеют сывороточную локализацию, то они могут повышать эффективность фагоцитоза, выполняя функции опсонингов.

В рамках исследования взаимоотношений паразит-хозяин на примере модели *Biomphalaria glabrata* – трематода *Schistosoma mansoni* было показано, что ключевое значение в распознавании гемоцитами моллюска спороцист *S. mansoni* играют именно белок-углеводные взаимодействия (Boswell, Bayne, 1986). При этом данные молекулы могут иметь как клеточную, так и сывороточную локализацию. Растворимые лектины гемолимфы, сходные по своей углеводной специфичности с ConA, ECA, SBA, TPA и WGA, были обнаружены в гемолимфе моллюска *B. glabrata* (Johnston, Yoshino, 1996). При этом полученные лектины обладали способностью связываться с гликопротеинами и гликолипидами, выделенными с поверхности тегумента спороцист *S. mansoni*. Следует отметить, что система *B. glabrata* – *S. mansoni* является крайне сложной для проведения сравнительно-иммунологических исследований. Весьма перспективными для выполнения такого рода работ служат системы моллюски-трематоды, в которых моллюск играет роль второго промежуточного хозяина. К таким системам относится выбранная нами модель двустворчатые моллюски *Mytilus edulis* – метацеркарии *Himasthla elongata*, некоторые результаты изучения которой приведены в настоящем сообщении.

### Материалы и методы

Объектом исследования стали мидии *Mytilus edulis*, собранные в июле 2008 г. районе Беломорской Биологической Станции «Картеш» им. О.А. Скарлато Зоологического института РАН. В экспериментах было использовано более 60 животных возраста 4–6 лет. Гемолимфу с клетками получали в туберкулиновый шприц из заднего аддуктора моллюска и консервировали 5% (по объему) 0,3 М раствора ЭДТА на фильтрованной морской воде (ФМВ). Клетки отделяли от гемолимфы центрифугированием (7 мин при 200g) и отмывали от ЭДТА модифицированным раствором Дальбекко без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , содержащим 25 г/л NaCl. При исследовании гуморальных факторов раствор ЭДТА к образцам гемолимфы не добавляли, центрифугирование проводили при аналогичных условиях.

Для изучения гемолитической активности безклеточной гемолимфы и циркулирующих клеток *M. edulis* в качестве клеток-мишеней использовались как интактные, так и опсонизированные различными лектинами эритроциты человека (ЭЧ). В рамках данной работы были использованы следующие лектины: лектин арахиса (PNA, специфичный к  $\beta\text{DGal}$ , Львовский НИИ гематологии и переливания крови, Украина), лектин завязей пшеницы (WGA, специфичный к  $\text{NAc}\alpha\text{DGlc}$ , Львовский НИИ гематологии и переливания крови, Украина), конканавалин А (ConA, специфичный к  $\alpha\text{DMan}$ , (Sigma, USA)), лектин улитки (HPA, специфичный к  $\text{NAc}\alpha\text{DGal}$ , Львовский НИИ гематологии и переливания крови, Украина), фитогемагглютинин (PHA, специфичный к  $\text{NAc}\alpha\text{DGal}$ , Sigma, USA), лектин сои (SBA, специфичный к  $\text{NAcDGal}$ , Львовский НИИ гематологии и переливания крови, Украина), лектин гороха (PSA, специфичный к  $\alpha\text{DMan}$ , Львовский НИИ гематологии и переливания крови, Украина), лектин бузины черной, (SNA, специфичный к  $\alpha\text{NAcNANA}$  (2→6)  $\text{Gal/NAcGal}$ , Львовский НИИ гематологии и переливания крови, Украина), лектин картофеля (STA, специфичный к  $\text{NAcGlc}_3$ , Львовский НИИ гематологии и переливания крови, Украина), лектин чечевицы (LCA, специфичный к  $\alpha\text{-Man}$ , Львовский НИИ гематологии и переливания крови, Украина). ЭЧ опсонизировались лектинами в субагглютинирующих концентрациях, после чего трижды отмывались избытком ФР (7–10 мин при 200g). Для постановки реакции гемагглютинации и гемолиза, методика проведения которых описана ниже, использовалась 1% суспензия ЭЧ, а для оценки гемолитической активности циркулирующих клеток *Mytilus edulis* – 4% суспензия ЭЧ в изотоническом растворе.

Титры гемагглютининов оценивали в реакции гемагглютинации (РГА) по общепринятой методике. РГА осуществляли в 96-луночных круглодонных планшетах для иммунологических реакций («Медполимер», Санкт-Петербург), заполняя лунки 50 мкл ФР. Серийные двукратные разведения исследуемых образцов гемолимфы готовили 8-канальной цифровой пипеткой («Ленпипет», Санкт-Петербург), перенося из лунки в лунку по 50 мкл серийных разведений индивидуальных образцов гемолимфы. Рабочую 1% суспензию ЭЧ добавляли в лунки по 25 мкл. Для оценки уровней

агглютинирующих факторов планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1,5–2 ч. Реакцию оценивали визуально. Результат реакции выражали в виде титра, равного  $-\log_2 X$ , где  $X$  – последнее разведение гемолимфы, обеспечивавшее формирование типичного агглютината. Гемолитическую активность гемолимфы определяли с помощью реакции гемолиза. Реакцию оценивали визуально через 3 ч после начала РГА. Результат также выражали в виде титра, равного  $-\log_2 X$ , где  $X$  – последнее разведение гемолимфы, при котором наблюдался выход гемоглобина из ЭЧ в раствор.

Для изучения гемолитической активности циркулирующих клеток *Mytilus edulis* был использован метод, являющийся безгелевой модификацией реакции локального гемолиза по Н.К. Эрне. Гемоциты переводили в полную культуральную среду на основе RPMI-1640 с содержанием 24 г/л NaCl, 10 мМ HEPES, 2% телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ L-глутамина и 100 мкг/мл пенициллина и 100 Ед/мл стрептомицина (все реактивы – «ПанЭко», Россия), устанавливая концентрацию гемоцитов равной 60 тыс. клеток в 1 мл среды. Клеточную суспензию вносили в 96-луночный планшет (Sarstedt) по 200 мкл, и добавляли 25 мкл 4%-ной суспензии интактных, предобработанных лектинами или десенсиализированных ЭЧ. После 3 ч инкубации при 10°C образцы центрифугировали (10 мин при 200g), и в надосадках оценивали выход гемоглобина из ЭЧ по оптической плотности (ОП,  $\lambda=405$  нм) на многоканальном спектрофотометре ПИКОН (Москва). Параллельно исследовалась способность гемоцитов, предобработанных лектинами, к лизису нативных ЭЧ. Для этого в культуры клеток вносили растворы лектинов в субагглютинирующих концентрациях, полученных в предыдущих работах, инкубировали 60 мин. при температуре соответствующей температуре морской воды в это время года, после чего добавляли 25 мкл 4%-ной суспензии клеток-мишеней. Для десенсиализации ЭЧ использовали 1% раствор трипсина на физиологическом растворе, который перед использованием был подогрет до 37° С, рН стабилизировали путем добавления 100 мкл 1М HEPES.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью пакетов программ Excel и STATISTICA 5.0. Итоговые результаты экспериментов выражали в форме средней арифметической и ее ошибки. Для определения статистически значимых различий между независимыми группами нормально распределённых данных использовали t-критерий Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Применение лектинов для решения основных проблем фундаментальной и сравнительной иммунологии, вирусологии и клеточной биологии является одним из перспективных методологических подходов. Лектины тесно связаны с исследованием структуры и функций клеточных мембран, что находит широкое применение в рамках исследования защитных реакций различных представителей беспозвоночных. В ходе серии собственных экспериментов была предпринята попытка оценить влияния лектинов с различной углеводной специфичностью на функциональную активность как циркулирующих клеток, так и белков гемолимфы на примере гемагглютининов и гемолизинов (см. таблица).

В литературе описано несколько способов взаимодействия лектинов и гемоцитов моллюсков (Fryer et al., 1996). Во-первых, это непосредственное связывание углеводов-распознающих структур гемоцитов с лигандами на поверхности патогена. Во-вторых, лектины, входящие или искусственно введенные в состав покровов модельных частиц (например, ЭЧ), взаимодействуют со специфическими углеводными структурами на поверхности гемоцитов, результатом чего является активация клеток. И, наконец, растворимые лектины гемолимфы могут полимеризоваться с образованием сложных комплексов, тем самым, вызывая агглютинацию эритроцитов. В рамках собственных экспериментов второй подход был реализован для исследования клеточных реакций врожденного иммунитета, а третий подход – для изучения гуморальных факторов гемолимфы *M. edulis*.

При исследовании цитолитической активности гемоцитов мидии *M. edulis* было установлено, что лектины, обладающие способностью специфически связываться с терминальными углеводами NAcGlc (лектины картофеля и завязей пшеницы) и NAcGal (лектины сои, бузины черной и улитки), повышают эффективность распознавания гемоцитами эритроцитов человека (см. таблица). Взаимодействие с лектинами приводит к активации гемоцитов, что сопровождается дегрануляцией и высвобождением в окружающую среду широкого спектра лизосомальных ферментов, в том числе ки-

слой и щелочной фосфатазы,  $\beta$ -гликозидазы, аминопептидазы, различных протеаз и липаз (Carballal et al., 1997), что, в конечном итоге, приводит к лизису эритроцитов.

Данные литературы также свидетельствуют о ведущей роли углеводов-распознающих рецепторов циркулирующих клеток моллюсков в процессах распознавания и элиминации патогена. Было показано, что, помимо влияния на цитотоксическую активность гемоцитов, лектины растительного и животного происхождения способны изменять кислородный метаболизм клеток (Hahn et al., 2000). Продукция активных форм кислорода достигала максимума при использовании в качестве стимулятора конъюгата БСА-Gal, что указывает на важную роль в реакциях распознавания молекул галактозы в терминальном положении. Еще одним примером подобных взаимодействий может служить участие лектинов, играющих роль опсонов при взаимодействии с чужеродными субстратами при фагоцитозе у различных представителей двусторчатых моллюсков (Tripp, 1992). Кроме того, использование лектинов, специфичных к NAcGlc и NAcGal, в качестве индукторов пролиферации приводило к достоверному увеличению уровня включения BrdU в гемоциты *M. edulis* (Pipe et al., 1997).

При постановке «обратного» эксперимента, т.е. при обработке гемоцитов лектинами, достоверное увеличение гемолитической активности клеток было зарегистрировано при использовании лектинов картофеля и сои, когда уровень гемолиза достиг  $0,214 \pm 0,024$  и  $0,242 \pm 0,022$  ед.ОП, соответственно. Полученные результаты однозначно указывают на то, что данные лектины способны непосредственно взаимодействовать с поверхностью гемоцитов, вызывая активацию клеток. Использование остальных лектинов не приводило к изменению гемолитической активности клеток. Можно предполагать, что некоторые лектины способны экранировать определенные рецепторы на клетках мидии, тем самым, снижая эффективность распознавания клеток-мишеней, что приводит к снижению уровня лизиса эритроцитов. Этот факт подтверждают данные литературы, указывающие на то, что лектины с различной углеводной специфичностью способны к избирательному связыванию с клетками моллюсков *Mytilus edulis*, *Cerastoderma edule* и *Ensis siliqua* (Wootton et al., 2003). Так, ConA взаимодействует с большинством циркулирующих клеток моллюсков вышеперечисленных видов моллюсков, тогда как лектины завязей пшеницы и арахиса связываются менее чем с половиной гемоцитов. Результаты эксперимента с десиализированными эритроцитами показали, что удаление гликокаликса с поверхности клеток приводит к снижению уровня гемолитической активности, что еще раз указывает на углеводную природу распознаваемых гемоцитами молекул. Вместе с тем, использование лектина сои приводило почти к 3-кратному увеличению цитолитической активности гемоцитов.

При исследовании углеводной специфичности гуморальных факторов гемолимфы мидии было показано, что титр гемагглютининов достоверно возростал лишь в случае обработки эритроцитов лектинами, специфичными к  $\alpha$ DMan (конА и лектин гороха). Незначительные, в среднем на одно двукратное разведение гемолимфы, увеличения титра гемолизинов были отмечены в случае обработки эритроцитов лектинами завязей пшеницы и арахиса, также специфичными к NAcGlc и NAcGal, соответственно.

Таким образом, в ходе серии экспериментов было показано, что опсонизация эритроцитов млекопитающих лектинами, специфичными к NAcGlc (лектины картофеля и завязей пшеницы) или NAcGal (лектины сои, бузины черной, арахиса и улитки), приводила к усилению гемолитической активности гемоцитов *M. edulis*. Среди гуморальных факторов гемолимфы было зарегистрировано достоверное увеличение титров гемагглютининов при обработке эритроцитов лектинами, специфичными к маннозе. Таким образом, клеточные механизмы врожденного иммунитета играют ключевую роль в распознавании патогена, а наличие углеводных детерминант, специфичных к NAcGlc и NAcGal, значительно повышает эффективность этих реакций. Гуморальные факторы, по-видимому, выполняют вспомогательные функции.

*Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00095, 07-04-01675 и ИНТАС № 05-1000008-8056.*

#### Литература

- Boswell C.A., Bayne C.J., 1986. Lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity in an invertebrate model: Con A does not act as a bridge // Immunology. V.57. P. 261–264.
- Carballal M.J., Lopez C., Azevedo C., Villalba A., 1997. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis* // J. Invert. Path. V. 70. P. 96–105.

- Castillo M.G., Yoshino T.P., 2002. Carbohydrate inhibition of *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell adhesion to primary sporocysts of *Schistosoma mansoni* // Parasitology. V. 125 (Pt 6). P. 513–525.
- Fryer S.E., Bayne C.J., 1996. Phagocytosis of latex beads by *Biomphalaria glabrata* hemocytes is modulated in a strain-specific manner by adsorbed plasma components // Dev. Comp. Immunol. V. 20. P. 23–37.
- Hahn U.K., Bender R.C., Bayne C.J., 2000. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation // Dev. Comp. Immunol. V. 24. P. 531–541.
- Johnston L.A., Yoshino T.P., 1996. Analysis of lectin- and snail plasma-binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni* // Parasitology. V. 112. P. 469–479.
- Pipe R.K., Farley S.R., Coles J.A., 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis* // Cell Tissue Res. V. 289. P. 537–545.
- Tripp M.R., 1992. Agglutinins in the hemolymph of the hard clam, *Mercenaria mercenaria* // J. Invert. Path. V. 59. P. 228–234.
- Wootton E.C., Dyrinda E.A., Ratcliffe N.A., 2003. Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) // Fish Shellfish Immunology. V. 15. P. 195–210.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СЕЗОННОЙ ЦИКЛИЧНОСТИ ПЕЛАГИЧЕСКОГО ЗООПЛАНКТОНА ОНЕЖСКОГО ОЗЕРА

М.Т. Сярки

Учреждение Российской академии наук Институт водных проблем Севера Карельского научного центра РАН,  
г. Петрозаводск, Россия  
e-mail: MSyarki@yandex.ru

Водные экосистемы обладают рядом свойств, которые диктуют необходимость особенных подходов к их исследованию. Ввиду специфики гидробиологических данных для их анализа не всегда применимы стандартные статистические методы. В связи с этим необходим поиск новых подходов к анализу гидробиологических данных (Шитиков и др., 2005; Розенберг и др., 2005). Важной проблемой анализа данных является оценка стохастической компоненты изменчивости. Поскольку гидробиологические данные обладают высокой изменчивостью и в пространстве, и во времени, то определение ее количественной оценки и вероятных причин становится актуальной задачей при определении современного статуса и прогнозирования состояния экосистем.

В природе практически для всех явлений характерна цикличность. Циклы имеют различные масштабы: суточные, месячные, годовые и многолетние (от 3 до 10–12 и более лет). При этом сезонная цикличность относится к самым заметным явлениям в озерах северных широт. Именно сезонные циклы объясняют до 70–80% изменчивости гидробиологических данных, особенно в планктонных системах (Страшкраба, Гнаук, 1989; Сярки, 2007), поэтому учет сезонной динамики необходим для любых оценок и прогнозов. Актуальной проблемой является также оценка реакции водных экосистем на изменение температурного режима. При климатических флуктуациях, например, возможном глобальном потеплении, сдвигаются не только амплитуды колебаний, но и сроки, а также продолжительность весеннего и осеннего периодов (Климат Карелии, 2004; Оценочный доклад..., 2008). Чтобы оценить реакцию природных экосистем, необходимо обратить внимание на даты и продолжительность периодов основных явлений в планктоне, а также на их межгодовую изменчивость. Если для наземных экосистем время событий можно наблюдать непосредственно и даты фиксировать в фенологическом сценарии, то для водных систем, особенно крупных озер, совместить сроки съемок и важных биологических событий невозможно, поэтому определение дат и периодов представляет важнейшую задачу, решить которую можно лишь с применением моделирования.

Большая часть работ, представленных в литературе, описывает сезонные изменения посредством скалярных усредненных величин, иногда с оценкой их разброса. Такие величины не очень подходят для описания процессов, т.к. значительная часть информации о динамике системы в них теряется. Для описания сезонной цикличности как процесса требуется использование динамических понятий – скорости, траектории, особые точки, фазовые сдвиги, синхронность процессов и т.д. Одним из самых известных динамических методов изучения природных систем является имитационное моделирование. Но он имеет определенные ограничения, и при увеличении числа моделируе-