

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Становова Мария Владиславовна

**Целомоциты пескожила *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta):
морфология и иммунные функции**

1.5.12 — зоология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА — 2022

Работа выполнена на кафедре зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научный руководитель** — **Косевич Игорь Арнольдович**,
кандидат биологических наук, доцент
- Официальные оппоненты** — **Слюсарев Георгий Сергеевич**,
доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ
ВО «Санкт-Петербургский Государственный
Университет», биологический факультет,
кафедра зоологии беспозвоночных, профессор
- **Алешин Владимир Вениаминович**,
доктор биологических наук, ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова», Научно-
исследовательский институт физико-
химической биологии имени А.Н. Белозерского,
отдел эволюционной биохимии, ведущий
научный сотрудник
- **Мюге Николай Сергеевич**,
кандидат биологических наук, Всероссийский
научно-исследовательский институт рыбного
хозяйства и океанографии (ФГБНУ
«ВНИРО»), лаборатория молекулярной
генетики, заведующий лабораторией

Защита диссертации состоится «19» декабря 2022 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.8(МГУ.03.07) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, ауд. 389.

E-mail: ksenperf@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/495534079/>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



К.С. Перфильева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Одним из наименее изученных вопросов в области биологии беспозвоночных животных является организация и функционирование иммунной, или защитной, системы. Тем не менее, именно эта система является ключевой в обеспечении жизни любого многоклеточного организма в потенциально опасной внешней среде. Annelida – одна из ключевых групп первичноротых животных. Несмотря на разнообразие и экологическую значимость этой группы, с иммунологической точки зрения она остается относительно слабо изученной. Основным компонентом иммунной системы аннелид являются свободные клетки целомической жидкости – целоמוциты. Они обеспечивают распознавание чужеродного материала, его последующую элиминацию или изоляцию. Целоמוциты также продуцируют гуморальные факторы, участвующие в иммунном ответе (Галактионов, 2005; Sima, 1994). На данный момент не существует единой системы классификации целоמוцитов аннелид. Основным критерием для типирования этих клеток была и остается их морфология, что не дает представления о функциональности разных типов целомоцитов. Имеющиеся в литературе данные получены с использованием различных подходов и часто сложно сравнимы друг с другом. Для наиболее полного понимания значения целомоцитов в жизнедеятельности целого организма необходимо иметь представление не только о морфологии и структуре клеточной популяции, но и непосредственно о функциональности этих клеток, в частности, их роли в иммунных реакциях. Сравнение этих параметров у представителей разных видов имеет значение для понимания путей эволюции клеточных защитных механизмов в пределах группы аннелид и беспозвоночных животных в целом. Таким образом, проведение комплексного анализа состава и функциональности клеточной популяции целомоцитов аннелид с использованием морфологических и молекулярно-генетических методов представляется важным.

Цели и задачи работы. Основной целью исследования являлся анализ состава и функций популяции целомоцитов у морского пескожила *Arenicola marina* (Linnaeus, 1758) с использованием современных методов и сравнение полученных данных с информацией по другим видам.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи: (1) обобщение имеющейся в литературных источниках информации о составе и функционировании иммунных систем аннелид; (2) описание морфологии и классификация популяции целомоцитов *A. marina*; (3) изучение клеточных защитных реакций целомоцитов *A. marina*; (4) изучение реакции целомоцитов *A. marina* на химическую индукцию иммунного ответа; (5) секвенирование и сборка транскриптома целомоцитов *A. marina*, анализ ключевых групп иммуно-ассоциированных молекул; (6) описание протеасомного комплекса целомоцитов *A. marina*.

Научная новизна. Впервые в рамках эксперимента проведен комплексный анализ состава клеточной популяции целомоцитов *A. marina* с использованием современных микроскопических, биохимических и молекулярно-генетических

методов. Экспериментально подтверждена избирательная иммунная реактивность разных типов целомоцитов. Впервые для представителя группы аннелид получен транскриптом целомоцитов. На основе анализа транскриптома описаны ключевые группы молекул, обеспечивающие системный иммунный ответ. Описан состав протеасомного комплекса целомоцитов и его реакция на экспериментальную индукцию иммунного ответа.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработанные методики работы с целомоцитами могут быть применены для дальнейших сравнительно-морфологических исследований, которые позволят расширить знания в данной области науки. Полученный в ходе работы транскриптом целомоцитов является первым общедоступным тканеспецифичным транскриптомом представителя аннелид. Это значимый вклад в дальнейшее изучение молекулярных основ функционирования и эволюции иммунных систем, так как доступные молекулярно-генетические данные для аннелид до сих пор очень ограничены. Информация об иммунных системах аннелид, обобщенная в литературном обзоре, может быть использована в качестве методического пособия при проведении курсов лекций и практик для студентов кафедр зоологии беспозвоночных и цитологии.

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования является комплексный подход к анализу морфологических, биохимических и молекулярно-генетических данных. Для изучения клеточных защитных реакций использовалась экспериментальная индукция иммунного ответа посредством корпускулярного и растворимого индукторов, а также внедрения инородных тел разной природы. Процесс инкапсуляции изучался с использованием световой и электронной микроскопии. Транскриптом целомоцитов был получен с помощью глубокого секвенирования образцов кДНК, полученных путем обратной транскрипции с выделенной из индуцированных целомоцитов РНК.

Положения, выносимые на защиту:

1. На основании анализа собственных результатов и литературных данных в популяции целомоцитов *Arenicola marina* выделено пять морфологически отличных типов амeboцитов: ювенильные, мелкие амeboциты (гранулоциты) с псевдоподиями, шнуровидные амeboциты, распластывающиеся веретеновидные амeboциты, распластывающиеся вакуолизированные амeboциты округлой формы. Эти типы выделяются как в живом, так и в фиксированном материале. При этом общее количество целомоцитов и относительное содержание разных клеточных типов не зависит от пола и размера особей и сезона наблюдений и, судя по всему, отражает в первую очередь физиологическое состояние конкретного организма.

2. Экспериментально показана роль разных типов целомоцитов в клеточных защитных реакциях. Два типа амeboцитов (веретеновидные и вакуолизированные) инициируют агрегацию других типов клеток в процессе фагоцитоза инородных частиц. Мелкие гранулоциты и шнуровидные амeboциты

осуществляют фагоцитоз и инкапсуляцию. В связывании антигенов, как и в случае фагоцитоза, активное участие принимают вакуолизированные и частично веретенovidные амебоциты.

3. Впервые получен транскриптом целомоцитов представителя аннелид. На молекулярном уровне пескожил имеет сложную многофакторную иммунную систему. В транскрипте целомоцитов присутствуют группы иммунно-ассоциированных молекул, как характерные для других беспозвоночных животных, так и таксон-специфические. Иммунная система пескожила на молекулярном уровне включает высококонсервативные и быстро эволюционирующие группы генов. Полученные данные и проведенный анализ выявляют группы молекул, потенциально участвующих в системном иммунном ответе, в качестве объекта дальнейших исследований.

4. Описан протеасомный комплекс целомоцитов *Arenicola marina*. Обнаружен функциональный сдвиг протеасомной системы в сторону гидролиза неубиквитинированных белков. Индукция воспаления вызывает полную элиминацию регуляторных частиц комплекса, синтез новых форм шаперонов и повышение химотипсин-подобной активности протеасом.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены и обсуждены на следующих конференциях:

1. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва, Россия, 11-15 апреля 2016);
2. V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России (Сочи, Россия, 4-8 октября 2016);
3. Society for Experimental Biology/SEB Annual Main Meeting (Гетеборг, Швеция, 3-6 июля 2017);
4. 4th International Congress on Invertebrate Morphology (ICIM4)/IV Международный конгресс по морфологии беспозвоночных (Москва, Россия, 18-23 августа 2017);
5. XIII Всероссийская конференция «Изучение, рациональное использование и охрана природных ресурсов Белого моря» (Санкт-Петербург, Россия, 17-20 октября 2017);
6. Юбилейная конференция в честь 160-летия кафедры зоологии беспозвоночных «ЗООЛОГИЯ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ – НОВЫЙ ВЕК» (Москва, Россия, 19-21 декабря 2018).

Публикации. По материалам работы опубликовано 9 печатных работ, из них 3 статьи – в научных журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus, Web of Science, RSCI WoS, и 6 статей – в материалах международных и всероссийских конференций. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами. Вклад соискателя в научных трудах [1] составляет 1/2; в научных трудах [3] составляет 1/3. В научных трудах [2] вклад автора определяющий.

Личный вклад автора. Автором диссертации совместно с научным руководителем разработан план исследования и проведен анализ полученных

результатов. Автором диссертации получена большая часть данных, представленных в работе. Автором выполнен анализ литературных источников. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, сбор, подготовку и обработку материала. Исследования морфологии целомоцитов и клеточных защитных реакций проведены автором. Результаты разделов «Протеасомный комплекс целомоцитов *A. marina*» и «Транскриптомный анализ иммунно-ассоциированных молекул в целомоцитах *A. marina*» получены в соавторстве. Вклад автора в изучение протеасомного комплекса: постановка экспериментов, сбор материала, конфокальная микроскопия. Обработка материала, анализ данных и подготовка публикации – совместно с Люпиной Ю.В. и коллегами. Вклад автора в транскриптомный анализ: постановка эксперимента, сбор проб РНК. Соавторами осуществлено секвенирование (Газизова Г.Р.) и сборка транскриптома (Горбушин А.М.). Анализ транскриптома и подготовка публикации – совместно с Горбушиным А.М.

Структура диссертации. Текст работы изложен на 145 страницах и состоит из введения, четырех глав: обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение результатов, — заключения, списка литературы и приложений. Приложение I включает 5 таблиц, Приложение II содержит 66 иллюстраций. Список литературы включает 167 источников, из которых 14 представлены русскоязычными источниками, а 153 — на иностранном языке.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во Введении обоснована актуальность темы исследования, показана степень ее разработанности, а также поставлены цели и задачи настоящего исследования.

Глава 1. Обзор литературы

Глава состоит из трех разделов. В первом разделе освещены общие сведения об иммунных системах беспозвоночных животных и представлена информация об используемой в области исследования терминологии. Также обсуждено современное состояние изученности представителей разных групп животных с иммунологической точки зрения, обсуждены основные проблемы, поднимающиеся исследователями. Второй раздел посвящен изучению морфологии, цитогенеза и функций клеточного компартмента иммунной системы аннелид – целомоцитов. В третьем разделе кратко описаны основные известные для представителей аннелид группы молекул, обеспечивающих системный иммунный ответ.

Глава 2. Материал и методы

В работе было использовано 150 особей морского пескожила *Arenicola marina*. Работа выполнена на взрослых особях, собранных в летние сезоны 2014–2018 гг. в окрестностях Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова МГУ (пролив Великая Салма). Во время проведения экспериментов червей содержали в проточном аквариуме с естественной морской водой при температуре около 8°C.

Целомическую жидкость отбирали из торакального отдела червей с помощью шприца и помещали на стекла (Рис. 1). Морфологию живых и зафиксированных и окрашенных разными способами целоцитов изучали на оптическом микроскопе с применением ДИКа. Для изучения участия целоцитов в клеточных защитных реакциях использовали липополисахарид клеточной стенки *Escherichia coli* (LPS) и частицы клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (зимозан А). Эксперименты проводили *in vivo* с введением индуктора в полость тела червей и *in vitro* на поверхности стекол. Для экспериментальной индукции реакции инкапсуляции инородные тела вводили в целомическую полость червей. В качестве инородных тел абиотической и биотической природы использовали стеклянные шарики и отрезки собачьей шерсти, соответственно. Полученные капсулы изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии, делали серии тонких и полутонких срезов для изучения с помощью световой и трансмиссионной электронной микроскопии. Для секвенирования транскриптома из образцов целоцитов 5 особей выделяли тотальную РНК, далее выделяли мРНК и готовили библиотеки кДНК для последующего секвенирования на Illumina HiSeq 2500. Сборка *de novo* транскриптома проводилась с помощью программного обеспечения Trinity-v2.8.6 (Haas et al., 2013). Филогенетический анализ полученных последовательностей осуществляли с использованием программного обеспечения BLAST+ для поиска гомологов. Эволюционный анализ проводился в пакете программ MEGA X (Kumar et al., 2018). Для изучения протеасомного комплекса целоцитов использовались методы нативного электрофореза, вестерн-блоттинга и иммуноцитохимии.

Глава 3. Результаты

Морфология целоцитов. Общая численность клеток в образцах целомической жидкости составляет от 2 до 17 миллионов на миллилитр жидкости, в среднем – 5-7 миллионов. Достоверной корреляции численности целоцитов с размером и полом животных при этом не наблюдается. Живые целоциты различаются по форме, размерам и поведению. Некоторые клетки распластываются на стекле и образуют псевдоподии различной формы и размеров, другие сохраняют четкую форму при наблюдении более часа (Рис. 1, В). При изучении фиксированных клеток разнообразие морфологических форм целоцитов зависит от использованных методов фиксации и окраски. Соотнести внешний вид живых и зафиксированных клеток не всегда удается, что осложняет классификацию целоцитов по морфологическим признакам. В целом, среди целоцитов пескожила можно отметить три основных морфологических типа, которые регистрируются всеми использованными методами. Первый тип клеток имеет веретенообразную форму, с более или менее выраженными подвижными отростками. Второй тип, встречающийся в целомической жидкости – небольшие (~10 мкм в диаметре) целоциты различной формы, часто близкой к округлой или овальной. Эти клетки образуют одну или несколько хорошо выраженных отдельных псевдоподий. На ТЭМ в их цитоплазме выявляется множество оптически плотных гранул. Третий основной тип целоцитов представлен клетками различного размера и формы, которые активно распластываются на

стекле, образуя ламеллоподии из прозрачной цитоплазмы без включений. Среди таких клеток большая часть имеет округлую или овальную форму, цитоплазма заполнена большим количеством вакуолей и включений, одна ламеллоподия окружает всю клетку. Кроме основных типов в образцах целомической жидкости отмечаются клетки смешанной или переходной морфологии. Отдельно выделяются клетки близкой к веретеновидной формы, склонные к распластыванию. Некоторые дополнительные типы клеток отмечаются не у каждого животного. Используя метку EdU (5-этинил-2'-деоксиуридин), мы обнаружили, что при коротком сроке инкубации (12-24 часа) метка накапливается в основном в мелких клетках с высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением – по всей видимости, ювенильных. Как и общая концентрация клеток, соотношение клеточных типов является индивидуальной характеристикой. Процентное соотношение типов клеток очень сильно варьирует между особями.

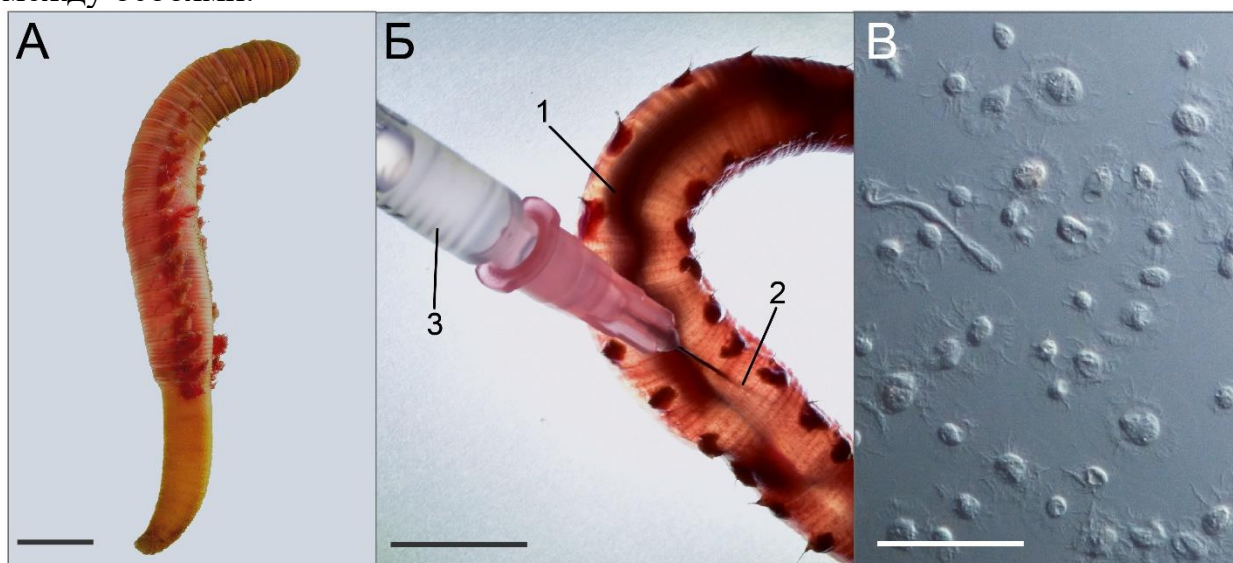


Рисунок 1. А – общий вид *Arenicola marina*. Б – отбор целомической жидкости: 1 – кишечник, 2 – положение иглы, 3 – прозрачная целомическая жидкость. В – живые целоциты на стекле, дифференциальный интерференционный контраст. Масштаб: А, Б – 1 см, В – 50 мкм (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022, с изменениями).

Участие целоцитов в клеточных защитных реакциях. Для подтверждения участия целоцитов в иммунном ответе и определения функциональности разных клеточных типов был проведен ряд экспериментов. После инъекции в целомическую полость суспензии зимозана в образцах целомической жидкости наблюдается активное формирование клеточных агрегатов (узелков), которые сохраняются даже при сильном разбавлении образцов водой или буфером. В течение первых 30 минут после инъекции число свободных клеток, не связанных с агрегатами, в образцах стремительно уменьшается. После 1 часа образцы целомической жидкости состоят в основном из плотных клеточных агрегатов. Морфология отдельных клеток в таких агрегатах утрачивает характерные черты, клетки теряют псевдоподии и отростки, округляются, включения некоторых клеток становятся выражено пигментированными без дополнительной окраски. Процесс агрегации *in vitro* на стекле происходит в следующем порядке: в первую

очередь частицы зимозана захватываются распластывающимися целоμοцитами с включениями (Рис. 2, А) и распластывающимися целоμοцитами вытянутой формы (Рис. 2, Б). Формирование монослоя происходит примерно так же, как в случае неразбавленных образцов целомиической жидкости, однако вытянутые клетки стремятся связаться с максимальным числом соседних клеток. Судя по всему, через формирующиеся цитоплазматические мостики между клетками фагоцитированные частицы могут передаваться другим клеткам. Следующими вокруг образованной сети из распластанных целомоцитов концентрируются округлые клетки с псевдоподиями и плотно прокрашиваемой цитоплазмой (Рис. 2, В). В течение часа препараты приобретают характерный вид: плотные агрегаты из клеток с уже неразличимой морфологией оказываются связаны друг с другом веретеновидными целомоцитами, отдельные округлые и вытянутые целомоциты мигрируют между агрегатами, в какой-то момент присоединяясь к ним. Распластанные округлые клетки с включениями служат центрами агрегации, и на препаратах, зафиксированных через 30 и более минут после начала индукции, отдельно не различимы.

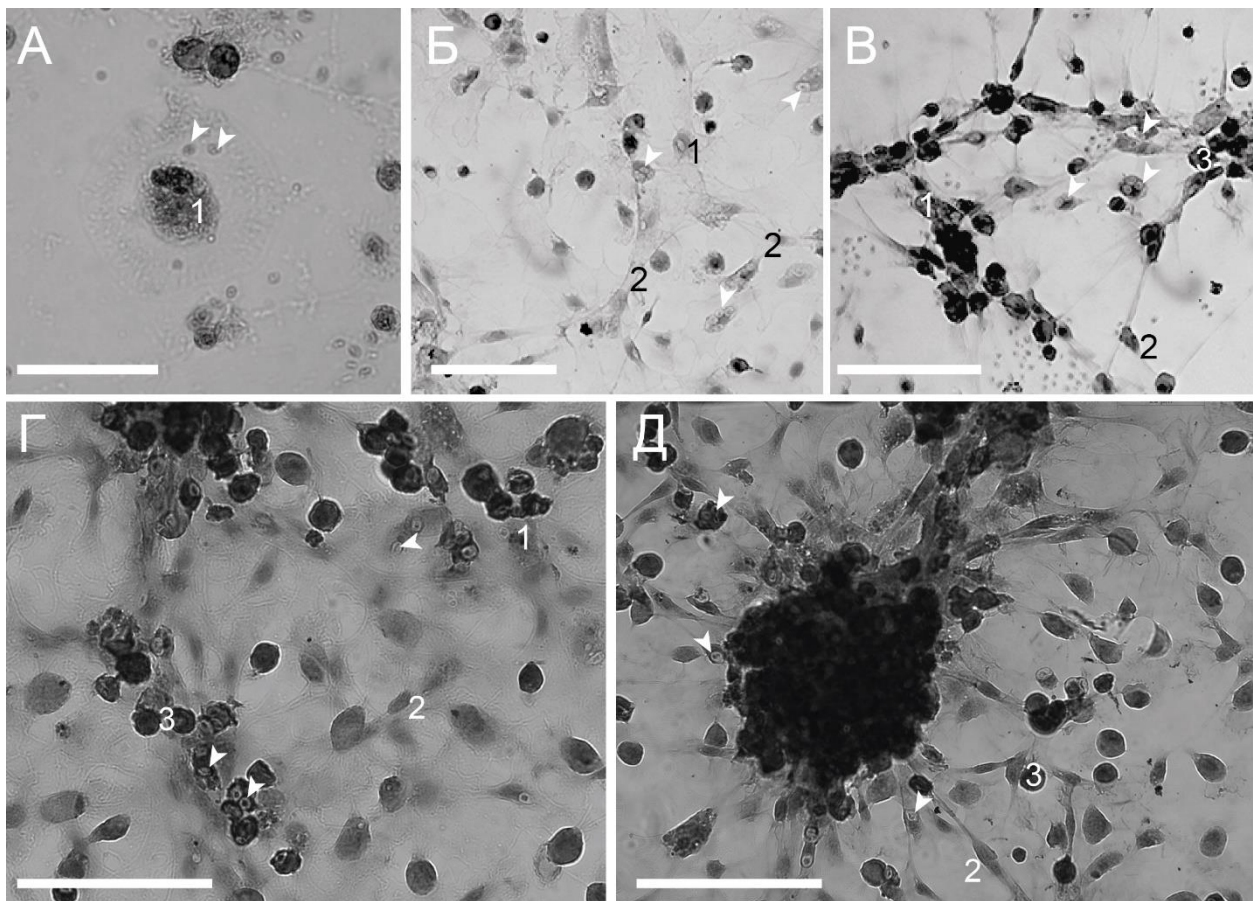


Рисунок 2. Целомоциты, зафиксированные на стекле, после смешивания с суспензией зимозана. А-В – фиксация через 15 минут, Б, В – фиксация через 30 минут, Д – фиксация через 1 час. Фиксация 4% PFA на FSW. Окраска гематоксилином по Караччи. Стрелками отмечены частицы зимозана. 1 – распластывающиеся целомоциты с включениями, 2 – распластывающиеся веретеновидные целомоциты, 3 – мелкие целомоциты с псевдоподиями. Масштаб 50 мкм.

Инкапсуляция инородных тел органической природы у *A. marina* происходит относительно быстро. Уже через сутки введенные в целомическую полость отрезки собачьей шерсти оказываются полностью покрыты клетками червя. На поперечных гистологических срезах капсул хорошо заметно, что клетки вокруг инородного тела располагаются последовательными концентрическими слоями. Строение капсул и морфология клеток в них различается в зависимости от времени инкубации. Во внутреннем слое капсул срока 4 суток клетки плотно упакованы, имеют несколько деформированные ядра и хорошо окрашенную цитоплазму. В среднем слое и клетки, и ядра более вытянуты. Во внешнем слое между клетками остаются свободные промежутки, видны переплетающиеся отростки клеток и отдельные амeboциты, пока не соединенные с самой капсулой (Рис. 3). На ультратонких срезах таких капсул хорошо видно, что внешний слой представлен подвижными клетками: они образуют многочисленные отростки, между которыми могут быть крупные промежутки.

Целоциты показывают неодинаковую реакцию на инъекцию LPS. Первыми реагируют амeboциты с включениями и частично веретеновидные амeboциты. Через 15 минут после инъекции наблюдается накапливание метки LPS на поверхности клеток и, по всей видимости, на мембранах вакуолей. Через час меченые клетки плотно окружаются другими. При фиксации более чем через час после инъекции флуоресцентная метка уже не проявляется.

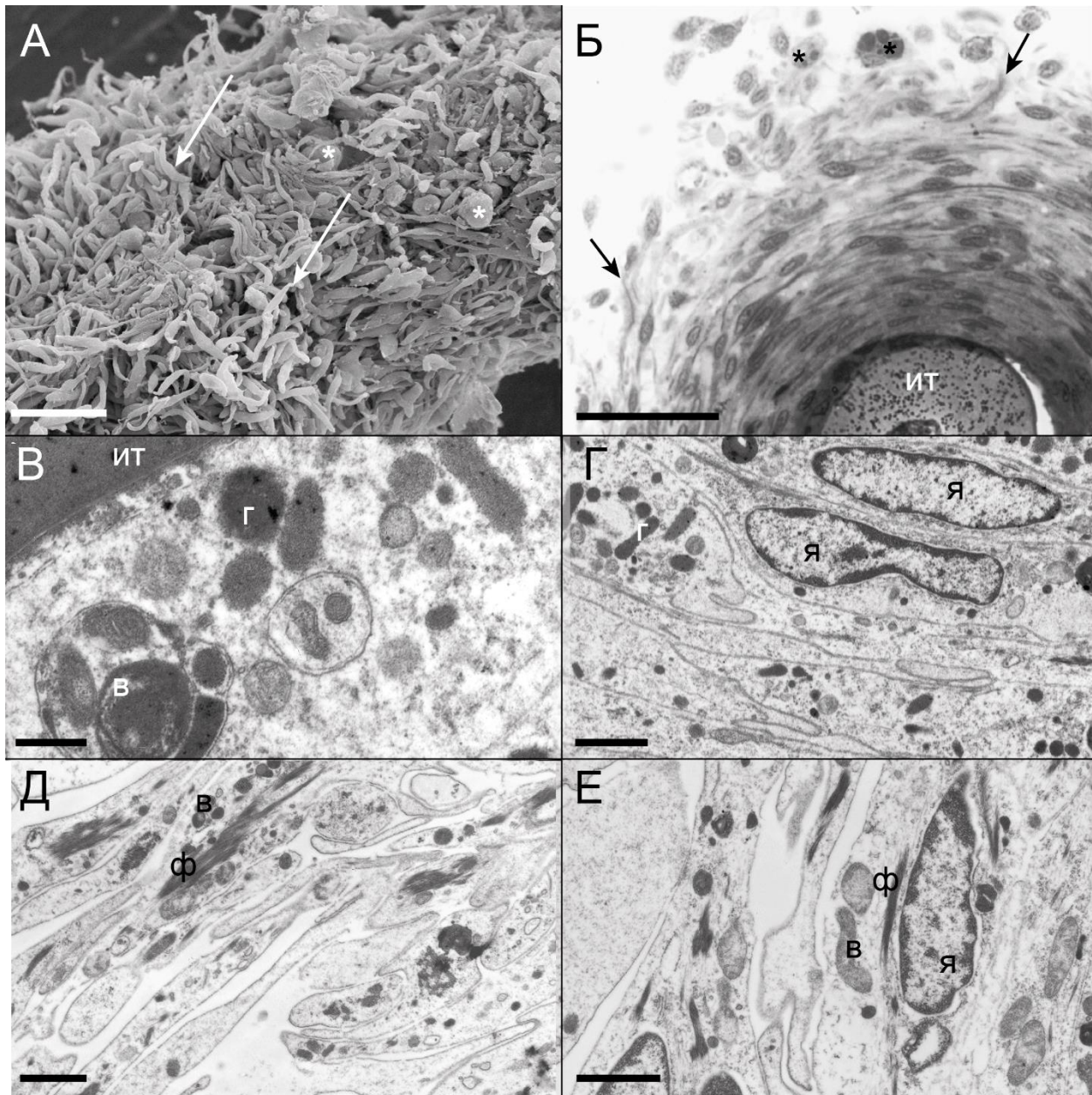


Рисунок 3. Капсула вокруг отрезка шерсти возраста 4 суток. А – СЭМ, стрелками отмечены подвижные отростки клеток. Масштаб 30 мкм. Б – поперечный срез капсулы. Масштаб 50 мкм. В-Е – ТЭМ поперечных срезов капсулы. Масштаб 1 мкм. Стрелками на рисунках А, Б отмечены отростки шнуровидных целомоцитов, звездочками – целомоциты с включениями. в – вакуоли с электронно-плотным содержимым, г – гранулы, ит – инородное тело, ф – филаменты, я – ядра.

Транскриптомный анализ целомоцитов. В транскриптоме целомоцитов мы идентифицировали 28693 «генов» (открытых рамок считывания, ORF), кодирующих белки длиной более 100 аминокислотных остатков (а.о.).

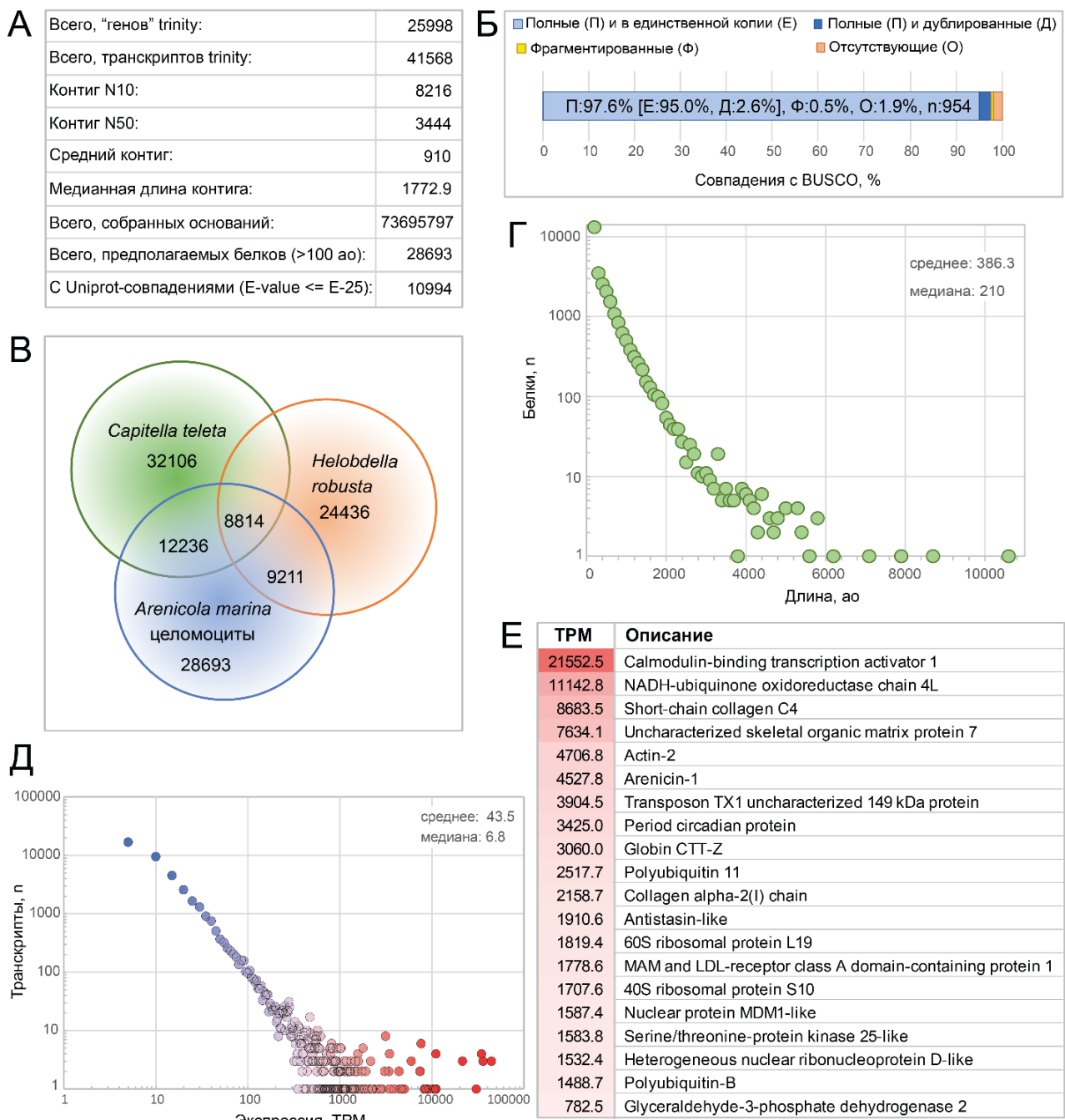


Рисунок 4. Характеристика сборки транскриптома целомотитов *A. marina*. А – суммарная статистика сборки; Б сравнительный анализ множества предсказанных белков с набором BUSCO (v4.1.4; Metazoa_odb10); В – сходство числа белков в транскриптоме целомотитов и белков, предполагаемых из геномов *Capitella teleta* и *Helobdella robusta* (диаграмма Венна); Г – распределение длины предполагаемых белков; Д – распределение экспрессии транскриптов (TPM) на основе оценки *in silico*; Е – экспрессия первых 20 аннотированных белков (распределение по величине экспрессии) (из Stanovova, Gazizova, Gorbushin, 2022).

Используя набор высококонсервативных однокопийных ортологичных последовательностей (BUSCO, «Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs») (Simao et al., 2015), мы обнаружили, что из 954 ортологичных генов многоклеточных животных в референсной сборке транскриптома целомотитов *A. marina* ~98% были полными, тогда как только 0,5% присутствовали во фрагментированном виде, а 1,9% отсутствовали (Рис. 4, Б). Для приблизительной

оценки доли генов, экспрессируемых в целомоцитах, и всех генов, прогнозируемых в геноме, мы провели поиск по двум существующим наборам геномных данных кольчатых червей: полихеты *Capitella teleta* (<http://genome.jgi-psf.org/Carca1/Carca1.home.html>) и пиявки *Helobdella robusta* (<http://genome.jgi-psf.org/Helro1/Helro1.home.html>), используя BlastP поиск с порогом E-value 1E-25. Только около трети всех белков, предсказанных в геномах *C. teleta* и *H. robusta*, имеют сходство с белками, экспрессируемыми в целомоцитах *A. marina* (Рис. 4, В). Количество (обилие экспрессии) транскриптов было рассчитано *in silico* как среднее значение TPM (транскриптов на миллион) для «гена» trinity в пяти отдельных образцах. Оно варьировало от 1,0 TPM (порог фильтрации) до 44400 TPM для некодирующей транскрибируемой последовательности РНК. На основе имеющихся данных о молекулярных основах иммунитета других животных мы провели анализ транскриптома и выявили набор белков, потенциально участвующих в системном иммунном ответе у *A. marina*. Описанные группы молекул, представляющих наибольший интерес для дальнейших функциональных и эволюционных исследований, включают белки системы прото-комплемента, широкий спектр лектин-подобных белков, Toll-like рецепторы и их сигнальный каскад, антиоксидантную систему, пороформирующие молекулы и антимикробные пептиды.

Протеасомный комплекс целомоцитов. При анализе транскриптома целомоцитов были обнаружены последовательности, кодирующие комплекс протеасомных белков. В комплекс входят 7 субъединиц типа α , 7 субъединиц типа β , 15 белков, входящих в состав регуляторных частиц PA200 и PA700, а также ряд белков, которые имеют высокую идентичность с зарегистрированными в глобальных базах данных как участвующие в сборке и регуляции активности протеасом. Высокая консервативность первичных последовательностей белков протеасомного комплекса подтверждается также филогенетическим анализом. При изучении функционирования комплекса мы обнаружили, что в норме в целомоцитах содержание 26S-протеасом ниже, чем это характерно для клеток млекопитающих. При этом достаточно высоко содержание субъединиц протеасом типа $\alpha 1, 2, 3, 5, 6, 7$ (Рис. 5, Б, 1), наблюдается небольшая концентрация протеолитической субъединицы $\beta 5$, а также отмечается субъединица Rpt6, входящая в состав регуляторной частицы PA700. Протеасомный комплекс целомоцитов выражено реагирует на экспериментальную иммунную индукцию. Через 1 ч после индукции воспаления введением LPS в целомоцитах наблюдается повышение химотрипсин-подобной активности (ХПА) протеасом (Рис. 5, А). В целомоцитах контрольных животных (введение стерильной морской воды, FSW) активность протеасом не изменяется.

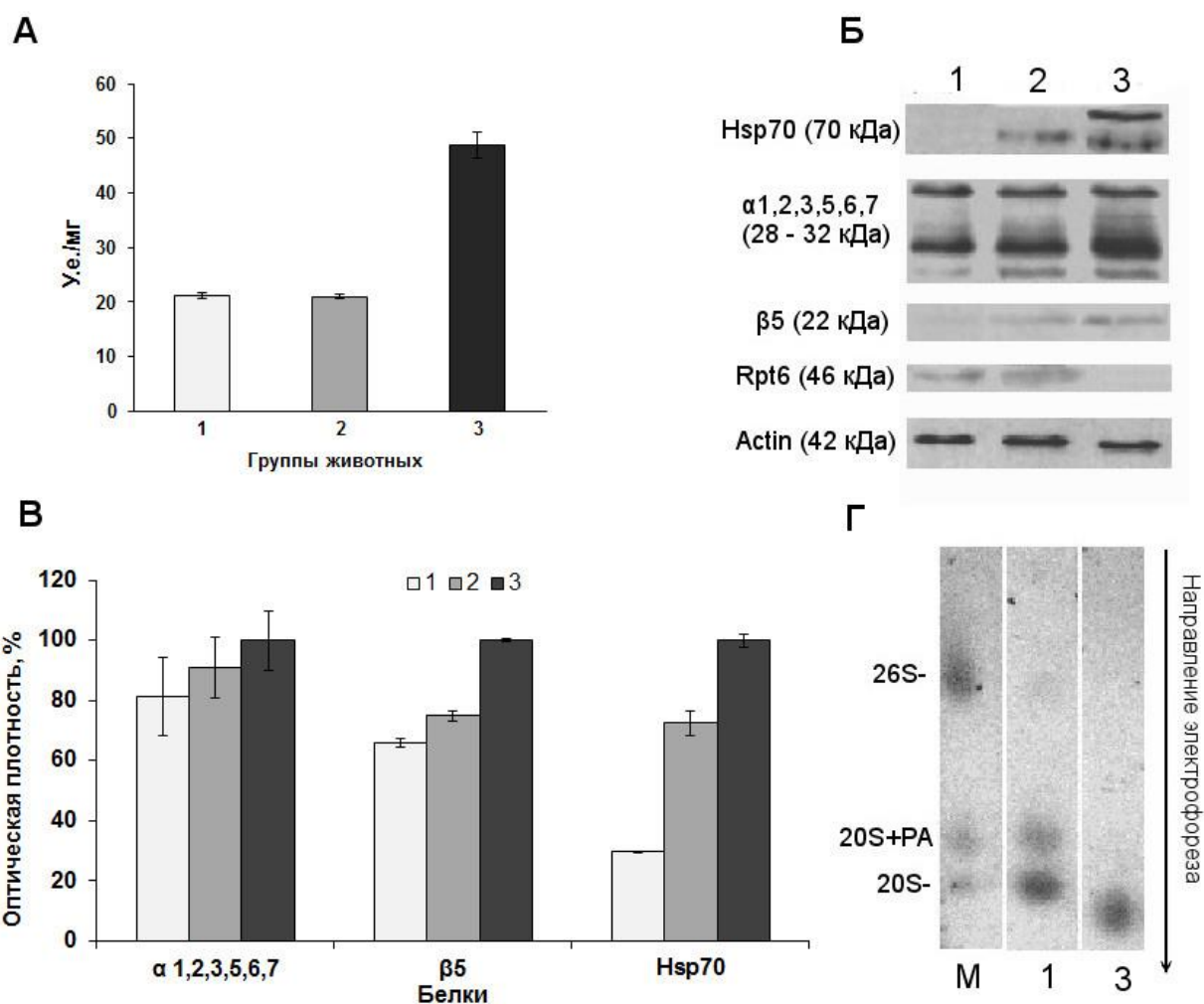


Рисунок 5. Изменения в протеолитической активности протеасом (А), содержании белков (Б, В) и в структуре протеасом в целомоцитах *A. marina* при введении липополисахарида. А – ХПА протеасом в целомоцитах (условные единицы на мг белка). Б – вестерн-блот субъединиц протеасом типа α 1, 2, 3, 5, 6, 7, β 5, Rpt6 и белков теплового шока Hsp70. В – величина относительной концентрации белков по сравнению с таковым актина в пробах фрагмента б рисунка. Г – ХПА протеасом в геле после электрофореза в нативных условиях. 1 – интактные черви, 2 – контрольная группа (через 1 ч после введения FSW), 3 – инфицированные черви (через 1 ч после введения ЛПС), М – маркер (экстракт клеток печени крыс) (из Stanovova et al., 2016).

Однако стресс, вызванный введением FSW, приводит к индукции шаперонов Hsp70 и к некоторому увеличению относительного содержания в целомоцитах субъединиц протеасом: структурных типа α , протеолитической β 5 и регуляторной Rpt6, входящей в состав регулятора PA700 (Рис. 5, Б, В, проба 2). Стресс, вызванный введением LPS, вызывает существенно более выраженные изменения в протеоме целомоцитов (Рис. 5, Б, В, пробы 3). Появилась новая индуцибельная форма Hsp70, значительно увеличивалось содержание протеасомных субъединиц типов α и β 5, тогда как субъединица Rpt6 регуляторного комплекса элиминировалась. Полученные данные также подтверждаются иммуноцитохимическим окрашиванием.

Глава 4. Обсуждение результатов

Морфология целомоцитов. Согласно полученным нами данным, в популяции свободных клеток целомической жидкости пескожила постоянно присутствуют несколько морфологических типов. При этом классификация живых целомоцитов не соотносится или соотносится не полностью с классификацией фиксированных клеток. В целом такая ситуация достаточно обычна при изучении целомоцитов и других клеточных элементов полостных жидкостей. Все целомоциты в той или иной степени способны к амебоидному движению.

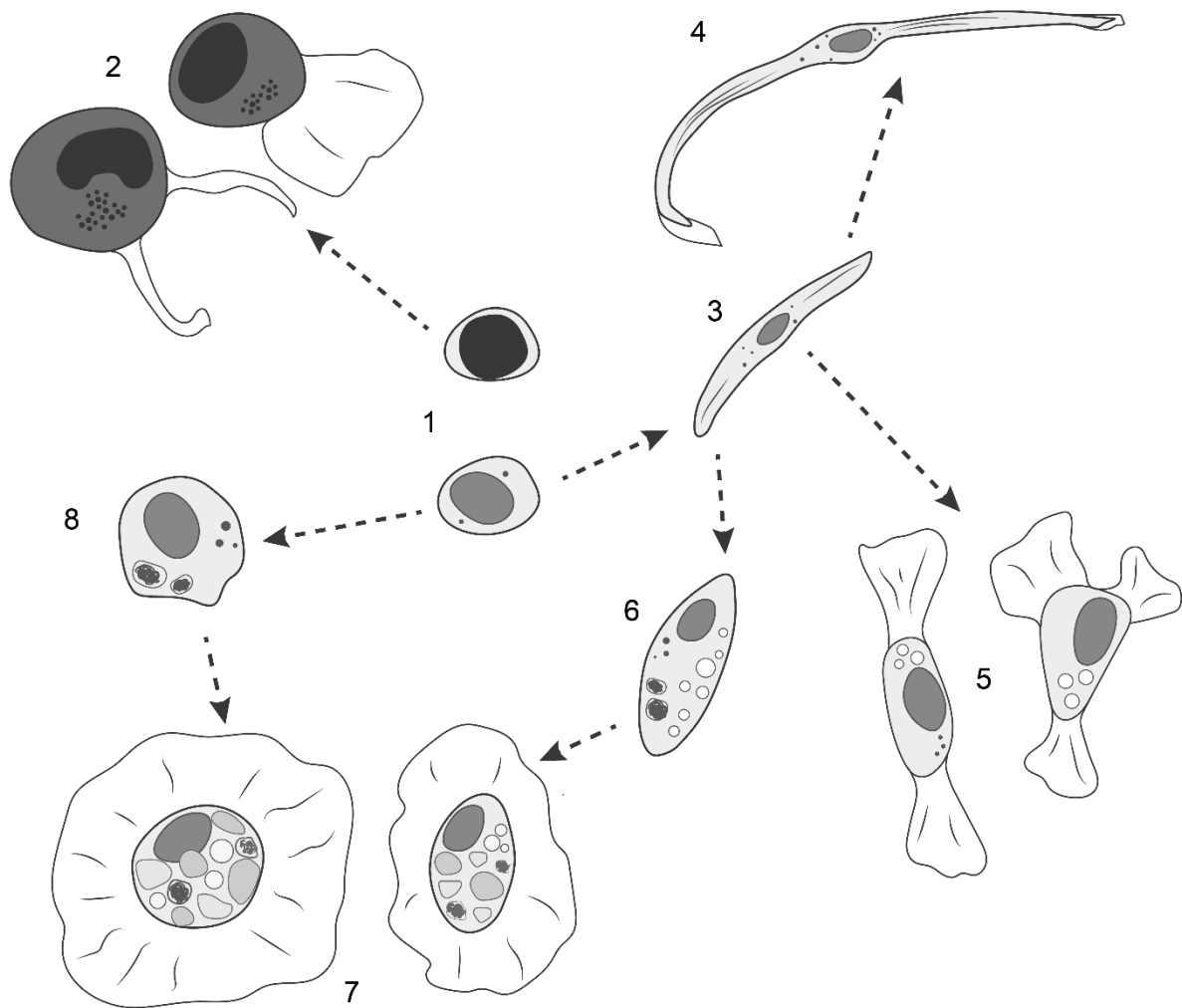


Рисунок 6. Гипотетическая схема взаимоотношений типов целомоцитов. 1 – ювенильные клетки, 2 – гранулоциты с псевдоподиями, 3, 4, 6 – веретеновидные целомоциты, 5 – распластывающиеся веретеновидные целомоциты, 7 – распластывающиеся вакуолизированные округлые целомоциты, 8 – мелкий целомоцит с фагосомами и прозрачной цитоплазмой.

Согласно самой общей классификации, все целомоциты пескожила относятся к амебозитам. Основываясь на наших данных, а также с учетом анализа литературных данных, можно выделить следующие характерные типы целомоцитов, различающиеся по морфологии и поведению: ювенильные; мелкие амебозиты (гранулоциты) с псевдоподиями и плотно прокрашиваемой цитоплазмой; веретеновидные (шнуровидные) амебозиты на разных стадиях дифференциации; веретеновидные амебозиты с прозрачной цитоплазмой,

склонные к распластыванию; распластывающиеся вакуолизированные целомоциты округлой формы. Вопрос гистогенетических взаимоотношений разных морфотипов целомоцитов пескожила остается открытым. Основываясь на поведении и морфологических признаках целомоцитов, мы можем предложить возможную схему цитогенетических взаимосвязей клеточных типов (Рис. 6), однако этот вопрос требует дальнейшего изучения. Очевидно, классификация целомоцитов, основанная исключительно на морфологических признаках, не является достаточно информативной с точки зрения устройства иммунной системы пескожила и аннелид в целом.

Участие целомоцитов в клеточных защитных реакциях. Фагоцитарная активность целомоцитов пескожила отмечена в литературе. При инъекции в целомическую полость бактерий в концентрации $1,80 \cdot 10^7$ клеток на миллилитр жидкости 60-75% бактерий оказывались поглощены целомоцитами в течение первых десяти минут, 90% – в течение первого часа после инъекции (Fitzgerald, Ratcliffe, 1989). При этом в целомической жидкости активно образовывались клеточные агрегаты, которые накапливали пигмент и превращались в «коричневые тельца». Кроме того, авторы отметили, что отдельные фагоцитирующие клетки мигрировали из целомической полости в окружающие ткани. Также отмечено, что целомоциты пескожила способны фагоцитировать оставшиеся после нереста гаметы (Персинина, Чага, 1994). По всей видимости, к фагоцитозу в той или иной степени способны все типы целомоцитов. Наши результаты показывают, что амебоциты с включениями и «веретенновидные» амебоциты начинают фагоцитировать в первую очередь, привлекая окружающие клетки для формирования агрегатов. При этом распластанные клетки, судя по всему, могут передавать фагосомы другим клеткам, становящимся частью агрегатов. У *A. marina* инкапсуляции подвергаются инородные тела как абиотической, так и биотической природы. Вместе с тем существуют данные, что у некоторых видов полихет – например, у *Nereis diversicolor* (Porchet-Hennere, Berri, 1987) – абиотические (возможно, инертные с иммунологической точки зрения) объекты не вызывают защитной реакции при попадании в целомическую полость червя. Наши данные показывают, что у *A. marina* реакция на стеклянные имплантанты все же выражена, хоть и в меньшей степени, чем реакция на органический имплантант. Можно говорить о том, что в случае инертных (стеклянных) имплантантов процесс инкапсуляции оказывается менее интенсивным и происходит медленнее по сравнению с инкапсуляцией биотического материала. Тем не менее, стеклянные шарики также воспринимаются организмом червя как инородный материал, что вызывает защитную реакцию. В процесс инкапсуляции у пескожила вовлечены целомоциты разных типов, однако на основании только морфологических данных нельзя утверждать, что разные типы клеток выполняют разные функции в этом процессе. Клетки поверхностного слоя капсулы остаются подвижными в течение продолжительного времени – 8-12 суток. У *A. marina* большая полость тела, и в торакальной части отсутствуют диссепименты, что позволяет целомической жидкости свободно перемешиваться. Поэтому оказавшиеся в целоме инородные тела двигаются вместе с жидкостью и все время оказываются под воздействием

многих клеток. Возможно, поэтому капсула постоянно окружается новыми подвижными клетками и долго не приобретает плотной структуры до момента полного уничтожения инородного тела. Можно предположить, что это свидетельствует о высокой иммунной активности амебоцитов пескожила. Связывание молекул LPS мембранами клеток говорит о наличии на них определенных паттерн-распознающих рецепторов, обеспечивающих узнавание чужеродного материала. Согласно нашим результатам, в популяции целомоцитов *A. marina* распознавание и связывание LPS осуществляют определенные типы клеток: вакуолизированные и веретенновидные амебоциты. Такая специфичность реакции позволяет предполагать, что разные типы целомоцитов *A. marina* имеют разный набор мембранных рецепторов, что говорит о принципиальном различии в их функциональности. В более ранних исследованиях (Fitzerald, Rattcliff, 1983) отмечалось дифференцированное реагирование субпопуляций целомоцитов *A. marina* на Грам⁺ и Грам⁻ бактерии. Авторы отмечали, что клетки, соответствующие в нашем описании распластывающимся вакуолизированным целомоцитам, активнее фагоцитируют Грам⁻ бактерии, что согласуется с нашими экспериментами.

Транскриптомный анализ целомоцитов. Имеющаяся молекулярно-генетическая информация о представителях группы аннелид обрывочна. Насколько нам известно, попытки отсеквенировать транскриптом конкретно популяции целомоцитов на представителях аннелид ранее не предпринимались. Анализ транскриптома позволяет считать, что эта сборка основана на глубоком чтении РНК пула целомоцитов и является подробной и информативной выборкой экспрессируемых в целомоцитах генов. Подготовленная нами база аннотированных белковых последовательностей представляет необходимый фундамент для точечного поиска и изучения конкретных белков. Анализ сборки транскриптома показывает, что пескожил имеет сложную молекулярную основу иммунного реагирования, представленную как консервативными, так и быстро эволюционирующими группами генов. Некоторые черты из представленных в транскриптоме характерны и для других представителей лофотрохозойных животных, однако в транскриптоме целомоцитов пескожила наблюдается выраженная таксон-специфичность. Мы обнаружили более 75 белков, предположительно действующих как полиморфные лектин-подобные паттерн-распознающие рецепторы. Другой особенностью является удивительно ограниченный арсенал порообразующих белков у *A. marina* по сравнению с другими видами беспозвоночных животных. Фенолоксидазная активность в целомоцитах осуществляется только лакказой, что объясняет неудачные попытки показать фенолоксидазную активность у пескожила биохимическими методами, так как для выявления активности лакказы требуется использование фермент-специфичного субстрата.

Протеасомный комплекс целомоцитов. Протеасомный комплекс играет ключевую роль в поддержании белкового гомеостаза в клетках эукариот. У млекопитающих выделены специализированные иммунные субъединицы протеасом, характерные для выполняющих иммунную функцию клеток. У беспозвоночных животных состав протеасом и их участие в иммунном ответе

практически не изучены. В рамках нашего исследования впервые изучен протеасомный комплекс целомоцитов аннелиды в норме и при развитии экспериментальной иммунной реакции. Характерной особенностью протеасом целомоцитов оказалось низкое содержание формы 26S по сравнению со стандартным паттерном протеасом клеток млекопитающих с превалирующей формой 26S и протеасомой 20S в комплексе с другими активаторами РА (Рис. 5, Г, дорожка М). Это свидетельствует о том, что в состоянии физиологической нормы протеасомная система целомоцитов пескожила специализируется преимущественно на гидролизе неубиквитинированных белков. Функциональный сдвиг протеасомной системы целомоцитов при индукции иммунного ответа приводит к протеолизу в «чистых» 20S протеасомах и хорошо согласуется с представлениями о том, что именно коровая форма 20S осуществляет гидролиз денатурированных, поврежденных и окисленных белков при стрессах разной природы у многоклеточных животных (Livnat-Levanon et al., 2014). В силу своей консервативности протеасомы являются удобной моделью для отработки биохимических методов работы с клетками немодельных организмов. При использовании отработанных на млекопитающих методик на беспозвоночных животных велика вероятность неспецифических реакций, например, при окраске антителами. Высокая степень идентичности первичных последовательностей протеасом у разных животных позволяет подтвердить степень достоверности используемых методов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ключевой компонент иммунных систем кольчатых червей – целомоциты, в целом изучены обрывочно. Из всего разнообразия представителей аннелид с точки зрения морфологии и функционирования иммунных клеток подробно изучено только несколько видов. Отсутствие универсальной классификации и общепринятого подхода к изучению связи морфологии и функций целомоцитов не позволяет делать сравнительных выводов на основании имеющейся на данный момент информации. Тем не менее, представители морских аннелид являются потенциально удобными объектами для изучения адаптивных возможностей «простых» иммунных систем, в том числе на молекулярном уровне. В нашей работе мы исследовали целомоциты распространенного вида аннелид – *Arenicola marina*, морского пескожила. На основании собственных данных, обобщенных с литературными, мы провели ревизию классификации этих клеток по морфологическим признакам. Нам удалось частично связать морфологию типов целомоцитов с их ролью в защитных реакциях разного характера. Получение любых молекулярно-генетических данных о целомоцитах аннелид на данный момент остается актуальным в связи с низкой степенью изученности группы в целом. Полученный нами транскриптом целомоцитов позволит оценивать участие отдельных белков, экспрессируемых в разных типах целомоцитов, в организации иммунного ответа. Первичный анализ транскриптома значительно расширяет представления о составе молекулярных факторов иммунитета у морских аннелид. Описанный нами набор белков, потенциально задействованных в системном иммунном ответе, является необходимой базой для дальнейших функциональных

и сравнительных исследований. Показанное нами отличие функционирования протеасомного комплекса целомоцитов от такового клеток млекопитающих является интересным подтверждением тому, что процессы адаптации к стрессу на молекулярном уровне у морских беспозвоночных могут в корне отличаться от таковых у позвоночных животных. Дальнейшее изучение целомоцитов других видов морских аннелид с применением подобного комплексного подхода позволит значительно расширить представления об иммунных системах аннелид и беспозвоночных животных вообще.

ВЫВОДЫ

1. На основании анализа собственных результатов и литературных данных в целомической жидкости *Arenicola marina* выделено пять морфологически отличных типов амебоцитов: (1) ювенильные, (2) мелкие амебоциты (гранулоциты) с псевдоподиями, (3) шнуровидные амебоциты, (4) распластывающиеся веретенovidные амебоциты, (5) распластывающиеся вакуолизированные амебоциты округлой формы. Распластывающиеся амебоциты не были ранее описаны у этого вида.
2. При изучении закономерностей реагирования целомоцитов на экспериментальную индукцию иммунного ответа выявлен различный вклад типов целомоцитов в осуществление фагоцитоза и инкапсуляции инородных тел. Два типа распластывающихся амебоцитов (веретенovidные и вакуолизированные) инициируют агрегацию других типов клеток в процессе фагоцитоза инородных частиц. Мелкие гранулоциты активно фагоцитируют и осуществляют реакцию инкапсуляции. Шнуровидные амебоциты также участвуют в процессе инкапсуляции.
3. В связывании липополисахарида *E. coli* активное участие принимают вакуолизированные и частично веретенovidные амебоциты.
4. Впервые отсеквенирован транскриптом целомоцитов представителя аннелид. Анализ транскриптома показывает, что иммунная система пескожила на молекулярном уровне включает как высококонсервативные, так и быстро эволюционирующие группы генов. Полученные данные и проведенный анализ выявляют группы молекул, потенциально участвующих в системном иммунном ответе.
5. Описан протеасомный комплекс целомоцитов *Arenicola marina*, состоящий из 43 белков, включая субъединицы протеасом и комплекс шаперонов. Обнаружен функциональный сдвиг протеасомной системы в сторону гидролиза неубиквитинированных белков. Индукция воспаления вызывает полную элиминацию регуляторных частиц комплекса, синтез новых форм шаперонов и повышение химотипсин-подобной активности протеасом.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus, Web of Science, RSCI WoS:

1. **Stanovova M.V.**, Erokhov P.A., Gornostaev N.G., Mikhailov V.S., Lyupina Yu. V. Role of proteasomes in non-specific immune response of marine annelids // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – Pleiades Publishing, 2016. – Vol. 471. – №. 1. – P. 428-430. **ИФ по WoS: 0,834.**
2. **Stanovova M.V.** Morphology, cytogenesis and functions of Annelida coelomocytes // *Invertebrate Zoology*. — 2019. — Vol. 16, no. 3. — P. 254–282. [in Russian, with English summary]. **ИФ по Scopus: 0,507.**
3. **Stanovova M.V.**, Gazizova G.R., Gorbushin A.M. Transcriptomic profiling of immune-associated molecules in the coelomocytes of lugworm *Arenicola marina* (Linnaeus, 1758) // *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*. — 2022. – P. 1–22. **ИФ по WoS: 2,368.**

Материалы конференций:

4. Люпина Ю.В., Лавров А.И., **Становова М.В.**, Абатурова С.Б., Ерохов П.А., Косевич И.А., Шарова Н.П., Михайлов В.С. Роль протеасом в молекулярных механизмах адаптации у холодноводных морских беспозвоночных // *Материалы Международной научно-практической конференции «Современные проблемы естествознания в науке и образовательном процессе»*, 22-23 октября 2015. — Изд.полигр. центр Белорусского пед. университета им. Танка, Минск. — Т. 12. — С. 31-31
5. Люпина Ю.В., Лавров А.И., **Становова М.В.**, Кравчук О.И., Абатурова С.Б., Ерохов П.А., Косевич И.А., Шарова Н.П., Михайлов В.С. Пластичность протеасом: молекулярный механизм адаптаций у холодноводных морских беспозвоночных // VII Российский симпозиум "Белки и пептиды". — Новосибирск, 2015. — С. 186-186.
6. **Становова М.В.**, Ерохов П.А., Косевич И.А., Михайлов В.С., Люпина Ю.В. Роль протеасом в развитии воспаления у *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta) // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). — 2016. — Т. 1, Спецвыпуск. — С. 210.
7. **Stanovova M.V.**, Kosevich I.A., Lyupina Y.V. Invertebrate immunity: *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta) as an experimental object // *Abstract book, SEB Annual Main Meeting, Gothenburg, 3-6 July 2017*. — Vol. 1. — 2017. — P. 267.
8. **Stanovova M.V.**, Kosevich I.A. Coelomocytes of *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta): morphology and functions // *The 4th International Congress on Invertebrate Morphology (ICIM4)*. — Издательство "Перо" Москва, 2017. — P. 247.
9. **Становова М.В.**, Косевич И.А. Изучение целоцитов морских аннелид с точки зрения иммунных функций (на примере пескожила *Arenicola marina*) // *Зоология беспозвоночных – Новый Век: материалы конференции, посвященной 160-летию Кафедры зоологии беспозвоночных Биологического факультета МГУ*

им. М.В. Ломоносова (19-21 декабря 2018 г.) / Под ред. И. И. Гордеева. — Москва, 2018. — С. 116.

Благодарности. Автор выражает свою самую искреннюю благодарность научному руководителю – Игорю Арнольдовичу Косевичу, за всестороннюю поддержку и понимание. Своим соавторам за сотрудничество и помощь в овладении новыми методами. Александру Михайловичу Горбушину за возможность осуществить сложный масштабный проект и бесценную помощь советом. Автор благодарит к.б.н. Е.И. Шагимарданову и к.б.н. О.А. Гусева за поддержку исследования. Автор благодарит заведующего межкафедральной лабораторией электронной микроскопии Биологического факультета МГУ Г.Н. Давидовича, ведущего инженера А.Г. Богданова и инженеров МЛЭМ и сотрудников Беломорской биологической станции им. Н.А. Перцова за предоставление возможности работы на трансмиссионном и сканирующем электронных микроскопах и конфокальном лазерном сканирующем микроскопе. Выражаю благодарность всем моим друзьям и коллегам за поддержку и помощь.