

На правах рукописи

ГРИНЧЕНКО
АНДРЕЙ ВИКТОРОВИЧ

**АГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И НОВЫЙ БЕЛОК-АГГЛЮТИНИН M_kC1_qDC
ГЕМОЛИМФЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MODIOLUS KURILENSIS*:
ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ТКАНЕВАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И СВОЙСТВА**

1.5.22. Клеточная биология

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Владивосток – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук **Кумейко Вадим Владимирович**

Официальные оппоненты:

Боголюбов Дмитрий Сергеевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, главный научный сотрудник (с возложением обязанностей заведующего лабораторией морфологии клетки)

Черников Олег Викторович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, заместитель директора по научной работе

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН»

Защита диссертации состоится «29» ноября 2022 года в 13 часов на заседании диссертационного совета 24.1.191.01 (Д 005.008.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Факс: (423) 2310-900, e-mail: nscmb@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.wimb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/54-grinchenko-andrej-viktorovich>

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, кандидат
биологических наук

Ващенко

Ващенко Марина
Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В последние десятилетия происходит интенсификация изучения молекул и клеток морских беспозвоночных, обеспечивающих эффективную адаптацию к факторам среды. Это обусловлено теоретической разработкой вопроса об эволюционном становлении защитных механизмов и связанных с ним тканей, клеток и молекул, что, в свою очередь, находит отражение в клеточной биологии, биохимии, сравнительной иммунологии и гистологии, а впоследствии и в соответствующих медико-биологических исследованиях. Кроме того, морские беспозвоночные являются источником уникальных соединений, которые находят широкое применение в медицине и биотехнологии. Особый интерес в связи с активным развитием биомедицинских разработок представляют углевод-распознающие белки-агглютинины, которые ранее относили только к лектинам, однако с прогрессом геномных исследований список групп лектин-подобных белков значительно расширился. Одной из таких групп являются C1q-домен-содержащие (C1qDC) белки, обладающие выраженными антимикробными свойствами и вероятным, но пока еще плохо изученным, противоопухолевым потенциалом. Однако несмотря на обнаруженную недавно широкую представленность в геномах *Bivalvia* соответствующих генов, выделенных в чистом виде и охарактеризованных C1qDC-белков на данный момент крайне мало.

Modiolus kurilensis Bernard, 1983 – один из широко распространенных на Дальнем Востоке видов морских двустворчатых моллюсков, образующий многочисленные плотные поселения в прибрежной зоне залива Петра Великого Японского моря. Обширная представленность, высокая численность на небольшой глубине (2–4 м) при отсутствии активного промысла делают данный вид привлекательным в качестве объекта исследований и биотехнологического ресурса. Ранее в некоторых работах *M. kurilensis* использовали как объект экологического мониторинга (Kavun, Podgurskaya, 2009; Yurchenko, Vaschenko, 2010; Подгурская, Кавун, 2012), однако исследований его защитных молекул и тканевых источников их синтеза не проводилось.

Степень разработанности темы. Гемолимфа, как одна из основных интегративных и реактивных тканей двустворчатых моллюсков, часто используется для оценки их физиологического состояния в биомониторинге (Song et al., 2010; Анисимова, 2013; Gerdol et al., 2018; Loker, Wayne, 2018). При этом чаще акцент сконцентрирован на клеточных показателях, а исследований системных гуморальных реакций представителей *Bivalvia*, которые давали бы более широкое представление о состоянии их здоровья, не так много (Loker, Wayne, 2018). Гуморальные защитные компоненты, в свою очередь, являются объектом повышенного интереса последних лет в основном в связи с развитием методов молекулярной биологии, биохимии и поиском новых ценных молекул для биотехнологии.

Среди углеводов-распознающих белков лектины, как наиболее известные и изученные, находят широкое применение и рассматриваются как потенциальные инструменты в различных областях, таких как гематология, гистохимия, клеточная биология, биохимия, вирусология, микробиология и медицина, как в аспекте исследований и диагностики, так и терапевтического потенциала (Mitchell et al., 2017; Devi, Basil-Rose, 2018; Catanzaro et al., 2019; Mishra et al., 2019; Wu, Liu, 2019; Hassan et al., 2020). C1qDC-белки являются другим относительно недавно открытым обширным мультигенным семейством углеводов-распознающих полипептидов, представленность кодирующих последовательностей которых в геномах ряда двустворчатых моллюсков исчисляется сотнями (Takeuchi et al., 2016; Sun et al., 2017; Mun et al., 2017; Powell et al., 2018; Gerdol et al., 2019), однако выделенных и описанных из них – единицы. Еще меньше работ касается их биомедицинского потенциала.

Цель и задачи исследования.

Целью данной работы являлся анализ агглютинирующей активности гемолимфы двустворчатого моллюска *Modiolus kurilensis* с идентификацией и изучением свойств нового углеводов-распознающего белка MkC1qDC.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: 1) исследовать активность защитных гуморальных факторов гемолимфы *M. kurilensis* с оценкой функциональной динамики в природных и экспериментально моделируемых условиях; 2) охарактеризовать углеводную специфичность агглютининов гемолимфы *M. kurilensis* и провести поиск не идентифицированных ранее углеводов-связывающих белков; 3) разработать схему эффективного выделения и описать физико-химические свойства нового углеводов-связывающего белка-агглютинина MkC1qDC из гемолимфы *M. kurilensis*; 4) методами иммуногистохимии выявить клеточный источник синтеза и тканевую локализацию белка MkC1qDC; 5) охарактеризовать антимикробные свойства белка MkC1qDC в отношении грам(+) и грам(-) бактерий; 6) оценить цитотоксическую активность белка MkC1qDC и его способность распознавать опухолевые клетки человека.

Научная новизна. Впервые обнаружен и выделен C1qDC-белок из гемолимфы *M. kurilensis* MkC1qDC, обладающий уникальной для данной группы высокой специфичностью в отношении гликанов на основе кислых галактанов и маннанов. Определены первичная структура и физико-химические свойства MkC1qDC, исследована его агглютинирующая и антибактериальная активность, установлена внутриклеточная локализация MkC1qDC в гранулярных гемоцитах и внеклеточная локализация в гемальной системе и интерстициальном компартменте. Показана способность нового белка связывать опухолевые клетки и влиять на их активность.

Кроме того, комплексно описаны и проанализированы особенности защитных реакций *M. kurilensis*, апробированы и стандартизированы методики оценки активности агглютинирующих и литических факторов гемолимфы моллюсков. Впервые установлены

границы их естественной вариативности у *M. kurilensis* в зависимости от места обитания и времени года. Показана сезонная динамика белкового профиля и активности защитных факторов плазмы моллюска. Описана динамика гуморального ответа *M. kurilensis* на введение инактивированных нагреванием бактерий *Staphylococcus aureus*, а также выявлены чувствительность исследованных показателей к хроническому стрессу в виде повышенной антропогенной нагрузки.

Теоретическая и практическая значимость. Впервые выделенный и охарактеризованный углевод-распознающий белок MkC1qDC является представителем C1qDC-белков двустворчатых моллюсков с характерной специфичностью к сиаловой кислоте и патоген-ассоциированным молекулярным паттернам (ПАМП), что обеспечивает выраженные антимикробные свойства. Разработан метод выделения белка MkC1qDC, имеющего наибольший аффинитет к гликанам на основе кислых галактанов и маннанов, который демонстрирует значительный биомедицинский потенциал в качестве молекулы, распознающей углеводные компоненты опухолевых клеток.

Предложенный в данной работе методологический подход к системной оценке агглютинирующей и литической активности гемолимфы моллюсков и приведенные доказательства их чувствительности к внешним и внутренним стрессорам позволяют применять выявленные параметры для создания быстрых и эффективных тест-систем оценки физиологического состояния двустворчатых моллюсков. Полученные в ходе представленной работы результаты существенно дополняют имеющиеся знания о защитных гуморальных реакциях *Valvia* и могут быть использованы в построении моделей и теорий иммунного ответа двустворчатых моллюсков.

Методология и методы диссертационного исследования. В работе использован широкий набор методов клеточной биологии и гистологии (культивирование клеток, морфологический анализ клеток и тканей, гистохимический и иммуногистохимический анализ, различные варианты световой микроскопии, включая конфокальную лазерную и автоматизированную количественную микроскопию), биохимии (выделение и очистка биополимеров, спектрофотометрия, различные варианты электрофореза белков, иммуноблотинг, гель-фильтрационная и аффинная хроматография), иммунологии (реакция гемагглютинации, получение поликлональных антител и иммунохимический анализ), молекулярного анализа (секвенирование методом Эдмана, масс-спектрометрия) и биоинформатики (*de novo* сборка пептидных фрагментов, поиск и выравнивание белковых последовательностей с использованием доступных баз данных, статистический анализ).

Личный вклад автора. Все экспериментальные данные, представленные в работе, получены лично автором или студентами под его руководством и при его непосредственном участии, за исключением инструментальной части N-концевого секвенирования MkC1qDC по Эдману и масс-спектрометрии его пептидных фрагментов, проведенных на базах

Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и Института генетики и молекулярной медицины Университета Эдинбурга (Великобритания), соответственно. Автор проводил первичный сбор материала, его обработку, планирование исследований и постановку экспериментов, документирование результатов и их анализ, непосредственно участвовал в написании научных публикаций, а также лично представлял результаты по теме исследования на конференциях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Впервые выделенный агглютинирующий фактор гемолимфы *M. kurilensis* MkC1qDC является новым C1q-домен-содержащим белком с уникальной специфичностью к гликанам на основе кислых галактанов и маннанов, выраженными антимикробными свойствами и сродством к углеводным паттернам опухолевых клеток. Для MkC1qDC характерна внутриклеточная локализация в гранулярных гемоцитах и внеклеточная локализация, ассоциированная с гемальной системой и интерстициальным компартментом.

2. Агглютинирующая активность, а также общая концентрация белков, литическая активность и содержание фракций полипептидов P124, P55, P78 плазмы гемолимфы *M. kurilensis* характеризуются в норме метастабильной динамикой в течение года и проявляют чувствительность к импульсному и хроническому стрессу.

Степень достоверности результатов. Повторяемость качества и количества выделения белка MkC1qDC, а также процедур по оценке его свойств и структуры при использовании современных высокоточных методов обеспечивают достоверность полученных результатов. Оценка исследованных показателей в сезонной динамике, в ответ на импульсное воздействие бактериями и хронический антропогенный стресс проводилась с постановкой предварительных экспериментов, тщательной проработкой методических аспектов, многократным повторением процедур и значительным объемом проанализированных выборок. Все первичные данные задокументированы и представлены в результатах в виде рисунков, графиков и таблиц.

Апробация работы и публикации. Результаты исследований были представлены в виде докладов на всероссийских и международных научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 11 работ: 4 статьи в отечественных и международных журналах, индексируемых РИНЦ, Scopus, Web of Science и рекомендованных ВАК, один патент на изобретение, 6 тезисов конференций.

Структура работы. Диссертация изложена на 167 страницах, включает список сокращений, введение, обзор литературы, материал и методы, результаты, обсуждение, выводы и список литературы. Работа содержит 34 рисунка и 4 таблицы. Список литературы включает 376 наименований, 355 из которых на иностранном языке.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность за ценные советы, создание благоприятной научной среды и комфортных условий работы своему научному

руководителю В.В. Кумейко, а также учителям, коллегам и наставникам А.П. Анисимову, И.Ю. Лисицыной, И.А. Кирсановой, А.А. Анисимовой, Н.П. Токмаковой и Н.Е. Зюмченко. Значительный вклад в понимание и проведение статистического анализа результатов внесли Е.Э. Борисовец и И.И. Пушин. Особую благодарность автор выражает Н.А. Шведу, а также своим ученикам и младшим товарищам, чей труд обогатил работу: Д.К. Корнейко, А.Е. Егоровой, Т.Д. Карп и Д.В. Ильяскиной. По-настоящему неоценимая помощь была оказана коллегой и верным товарищем Ю.Н. Сокольниковой.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы

Объект исследования и сбор материала. Объектом исследования являлась бесклеточная гемолимфа (плазма) двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis* (Bivalvia, Mutilidae; Bernard, 1983). Половозрелых особей с длиной раковины 75–95 мм собирали водолазным способом с глубины 2–4 м из акваторий залива Петра Великого Японского моря. Основным местом сбора моллюсков являлся залив Восток (N42.892078°, E132.737502°). На животных из данной акватории проводили исследование естественной вариативности и сезонной динамики показателей, ответ на бактериальную стимуляцию и сравнение с импактной акваторией – Спортивной гаванью Амурского залива (N42.892078°, E132.737502°). Животных для выделения белка MкC1qDC и последующего его описания также брали из залива Восток и Амурского залива (N43.200788°, E131.914084°).

Сбор гемолимфы производили из синуса заднего мускула-замыкателя одноразовыми стерильными шприцами с последующим переносом образцов в пробирки на ледяной бане (0 °C), которые затем центрифугировали в течение 12 мин при 800 g, 4 °C. Супернатант (плазму) отбирали в криопробирки, которые сразу же помещали для заморозки в жидкий азот (–196 °C) с последующим переносом в низкотемпературную морозильную камеру (–80 °C) для длительного хранения. Данные по фагоцитарной активности гемолимфы и гистопатологиям почек и пищеварительной железы у исследованных *M. kurilensis* предоставлены младшим научным сотрудником лаборатории физиологии Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмундского Сокольниковой Ю.Н.

Физиологические эксперименты в моделируемых условиях. Для исследования особенностей динамики исследуемых показателей гемолимфы *M. kurilensis* на введение бактерий моллюсков предварительно акклимировали к аквариумным условиям, после чего проводили отбор особей с наиболее характерными значениями иммунных показателей: медиана \pm 30 % по агглютинирующей и фагоцитарной активности гемолимфы. Отобранных животных делили на группы для каждой из 10 исследованных временных точек (от 3 ч до 336 ч), в которых моллюскам вводили либо стерильную морскую воду в качестве контроля, либо суспензию термически инактивированных бактерий *S. aureus* (по 16 особей в каждой

контрольной и экспериментальной точке). Оценку ответа проводили на основе сравнения показателей до и после введения препарата.

Определение агглютинирующей и литической активности гемолимфы.

Оценивали агглютинирующую и литическую активность плазмы, а также ее белковый профиль. Реакцию прямой гемагглютинации (РГА) проводили по классической методике (Кэтти и др., 1991) в иммунологических круглодонных планшетах при титровании плазмы гемолимфы с фиксированными эритроцитами (Эр) человека группы крови 0 (предварительно проводили подбор условий, таких как тип и концентрация Эр). Для определения углеводной специфичности агглютининов плазмы *M. kurilensis* было проведено ингибирование реакции гемагглютинации (ИРГА) сахарами различной структуры. Литическую активность оценивали с помощью оригинальной методики гемолитической реакции (ГЛР), разработанной на основе существующих методик (Rowe, Welch, 1994; Armstrong et al., 1996; Hu et al., 2011), по степени выхода гемоглобина в раствор после инкубации суспензии Эр с плазмой *M. kurilensis*. В данном случае также проводили предварительный подбор концентраций Эр и ионов кальция. Анализ белкового профиля включал оценку общей концентрации белков (C_p) по светопоглощению нативной плазмы при длине световой волны 280 нм (A_{280}), а также оценку процентного содержания белковых фракций плазмы на основе электрофореза по Лэммли с окрашиванием гелей красителем CBV G-250 (Laemmli, 1970).

Выделение и выявление основных физико-химических свойств белка MkC1qDC.

Выделение нового углеводов-распознающего белка проводили в несколько этапов. Вначале белки плазмы *M. kurilensis* фракционировали высаливанием сульфатом аммония (СА), проводя ступенчатое повышение насыщения СА до 15 %, 30 %, 45 %, 60 %, 75 % и 85 %. Полученные центрифугированием после каждой ступени высаливания СА белковые осадки растворяли в TBS (Tris-buffered saline: 10 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,5) и освобождали от остатков СА путем диализа. На следующем этапе проводили аффинную хроматографию с использованием в качестве носителя сефарозы CL-4В с ковалентно иммобилизованными дивинилсульфоном молекулами пектина цитрусовых со степенью этерификации 60 % (Copenhagen Pectin A/S, Дания). Раствор белков с выявленной с помощью РГА и ИРГА целевой активностью осветляли центрифугированием (30 мин, 10000 g, 4 °С). Уравновешивание, нанесение образца и промывку колонки проводили раствором TBS с 15 мМ CaCl₂. Элюцию проводили раствором TBS большой буферной емкости, содержащим хелатирующий агент: 200 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 30 мМ Na₂ЭДТА, pH 7,5. Элюат, содержащий вышедшие в растворе с ЭДТА белки, собирали и диализировали против TBS без добавок, после чего полученный раствор разделяли на аликвоты, содержащие по 100 мкг белка в криопробирки, которые замораживали и хранили в жидком азоте (-196 °С).

Определение массы выделенного MkC1qDC и изоэлектрической точки (pI) проводили методом 2D-электрофореза: изофокусирование в первом направлении с использованием

коммерческих полимерных полосок (стрипов) с градиентом pH 5–8 "ReadyStrip™ IPG Strips" (Bio-Rad, США) и электрофорезом по методике Лэммли в градиентном 4–20 % полиакриламидном геле во втором направлении. Для последующего анализа полипептидов методом N-концевого секвенирования по Эдману проводили электрофорез очищенного препарата MkC1qDC по Лэммли, затем электроблотингом образцы переносили на поливинилиденфторидную мембрану (Novex, США), из которой вырезали целевую полосу и отправляли ее для анализа на автоматическом секвенаторе белков Precise модели 492 (Applied Biosystems, США) с использованием протокола производителя.

Для анализа пептидного состава MkC1qDC образцы очищенного белка MkC1qDC обрабатывали трипсином, и далее полученные фрагменты анализировали на масс-спектрометре Fusion Lumos (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме работы "high / high" с разрешением 120k / 35k (MS и MS / MS). Секвенирование *de novo* проводили с использованием программы PEAKS (Bioinformatics Solutions, Канада) с точностью массы 5 ppm / 0,01 Да (MS и MS / MS). Сборку полной аминокислотной последовательности производили с использованием ALPS ассемблера де Брёйна (Tran et al., 2016) и наиболее близкого гомолога MgC1q4 из *Mytilus galloprovincialis* (CBX41653.1) в качестве референса. Теоретические Mr и pI собранного MkC1qDC были определены с помощью программы ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Термоллабильность и pH-зависимость MkC1qDC оценивали с помощью РГА, проводя предварительное инкубирование белка в течение 1 ч либо при температурах 0 °С, 10 °С, 20 °С, 30 °С, 40 °С, 50 °С, 60 °С или 70 °С, либо в растворах с pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Для определения углеводной специфичности MkC1qDC проводили ИРГА с использованием серии двукратных разведений растворов различных сахаров и оценкой концентрации полумаксимального ингибирования (half maximal inhibitory concentration, IC50).

Оценка антибактериальной активности белка MkC1qDC. Антимикробные свойства MkC1qDC проверяли в отношении условно патогенных грам(–) бактерий (*Vibrio* sp., *Ruegeria* sp., *Escherichia coli*, *Pseudoalteromonas* sp.) и грам(+) бактерий (*S. aureus*, *Bacillus subtilis*), выделенных из морских организмов. Для оценки влияния MkC1qDC на бактериальный рост культуры выращивали до log-фазы в жидкой среде на основе морской воды (Youshimizu, Kimura, 1976), после чего разводили в обедненной жидкой среде (1,5 % пептон, 1,5 % NaCl, pH 7,2) до $A_{600} = 0,05$ и переносили в 96-луночный плоскодонный планшет. В экспериментальные лунки к бактериям добавляли MkC1qDC (10 мкМ). В качестве контроля использовали суспензии бактерий без добавок и с добавлением смеси антибиотиков: пенициллин (1000 ед./мл) и стрептомицин (1 мг/мл). Анализ проводили на планшетном спектрофотометре Cytation 5 imaging reader (BioTek Instruments, США), измеряя оптическую плотность A_{600} каждый час в течение 48 ч при температуре инкубации 37 °С.

Агглютинирующую активность MkC1qDC оценивали в отношении термически инактивированных фиксированных бактерий, окрашенных FITC. Реакцию проводили в микропробирках при постоянном перемешивании и конечной концентрации компонентов: суспензии бактерий с оптической плотностью $A_{600} = 1,5$, 10 mM HEPES-NaOH (pH 7,5), 150 mM NaCl, 50 mM CaCl₂, 3,4 мкМ или 0 мкМ (контроль) MkC1qDC. После 1 ч инкубирования при 23 °С суспензии наносили на предметные стекла и анализировали с помощью конфокального микроскопа FluoView FV1200MPE (Olympus, Япония).

Выявление локализации MkC1qDC в тканях *M. kurilensis*. Для проведения иммуногистохимического анализа были получены фракции антител IgG кролика к MkC1qDC со схемой иммунизации и очистки, составленной на основе существующих рекомендаций (Кэтти и др., 1991) и включающей инъекции по 250–500 мкг очищенного MkC1qDC с полным и неполным адъювантом Фрейнда. Эффективность выработки антител и их специфичность определяли с использованием коммерческих вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, и ортофенилендиамином в качестве субстрата в иммуноферментном анализе (ИФА), или Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, США) для хемилюминесцентной окраски в Вестерн-блоттинге.

Выявление MkC1qDC проводили на препаратах фиксированных гемоцитов (общей популяции и предварительно фракционированных центрифугированием в ступенчатом градиенте плотности) и на парафиновых срезах кишечника, мантии, мускула-замыкателя, перикарда, жабр, гонад, пищеварительной железы (ПВЖ) и почек *M. kurilensis*. Фиксацию осуществляли 4 % параформальдегидом в фосфатном буферном растворе (10 mM Na₂HPO₄-KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4). Заливку образцов в парафин, приготовление срезов толщиной 10 мкм и их депарафинирование проводили по стандартной методике (Роскин, Левинсон, 1957). Окраску препаратов проводили с использованием полученных антител кролика, вторичных антител козы с Alexa Fluor-488 (Thermo Fisher Scientific, США) и выявлением ядер красителем DAPI (Invitrogen, США). Контрольные препараты вместо первичных антител обрабатывали сывороткой кролика, полученной до иммунизации. Анализ проводили на конфокальном микроскопе Olimpus FV10i (Olimpus, Япония).

Оценка взаимодействия MkC1qDC с клеточными линиями человека. Оценку IC₅₀ MkC1qDC проводили с помощью МТТ-теста (Mosmann, 1983). Для этого в 96-луночные планшеты рассеивали клеточные линии HeLa CCL-2 (АТСС, $1,5 \times 10^4$ клеток/см²), MDA-MB-231 (АТСС, $0,5 \times 10^4$ клеток/см²), U87 MG (АТСС, $1,0 \times 10^4$ клеток/см²) и hTERT RPE-1 (АТСС, $1,0 \times 10^4$ клеток/см²). После 18 ч предварительного культивирования в среду вносили MkC1qDC до конечных концентраций 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ и 0 мкМ в качестве контроля (по 8 лунок). Через 48 ч проводили окраску и измерение оптической плотности (OD). IC₅₀ рассчитывали на основании регрессионной прямой, построенной по полученным средним значениям OD для каждой использованной концентрации MkC1qDC.

Оценку механизма клеточной гибели при воздействии MkC1qDC проводили с использованием витальной окраски комбинацией йодистого пропидия и аннексина V (Thermo Fisher Scientific, США) в 96-луночных планшетах при тех же условиях, времени культивирования и плотности посадки указанных выше клеточных линий, используя конечные концентрации MkC1qDC 5 мкМ и 0 мкМ (контроль). Клетки окрашивали в лунках по протоколу производителя с небольшими модификациями и проводили съемку на планшетном ридере Cytation 5 imaging reader (BioTek Instruments, США).

Для оценки сродства MkC1qDC к углеводным детерминантам клеток указанных выше линий белок предварительно конъюгировали с флуоресцентным красителем FITC. Клетки высевали в 8-луночные камеры Ibidi (Ibidi, США) и после 36 ч культивирования окрашивали 2 мкМ раствором MkC1qDC-FITC 30 мин при 23 °С. Ядра докрашивали Hoechst 33342 (Invitrogen, США). Анализ проводили на конфокальном микроскопе Olympus FV10i (Olympus, Япония).

Статистический анализ проводили методами непараметрической статистики, используя ранговый дисперсионный анализ Краскела–Уоллиса, парный критерий для независимых выборок Манна–Уитни, парный критерий для зависимых выборок Уилкоксона и ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Величины измеренных показателей в работе выражены в виде средних значений с 95 % доверительными интервалами (ДИ).

Результаты и обсуждение

Метастабильный статус динамики агглютинирующей и литической активности плазмы гемолимфы *M. kurilensis* в течение года. Сезонная динамика исследованных показателей у *M. kurilensis* из залива Восток проявляется в небольших вариациях в пределах устойчивых диапазонов показателей РГА (агглютинирующие факторы, рис. 1А) и ГЛР (литические факторы, рис. 1Б) в течение всего года, со значимым снижением лишь в выборке января, характеризующегося наименьшей температурой среды. Высокая стабильность агглютинирующей активности плазмы гемолимфы при различной температуре среды ранее уже была показана для других представителей *Bivalvia*, таких как модиолус *Modiolus modiolus* (Tunkijjanukij et al., 1997) и устрица *Crassostrea gigas* из вод Атлантики (Olafsen et al., 1992). Снижение активности литических факторов в холодные периоды было также отмечено у *Ruditapes philippinarum* (Soudant et al., 2004) и *M. galloprovincialis* (Santarem et al., 1994; Malagoli et al., 2007).

Сезонная динамика общей концентрации белка (C_p) значительно отличалась от динамики активности описанных выше гуморальных факторов (рис. 1В). Летом и осенью показатель C_p был ниже, чем зимой и весной. Исследования данного параметра у *M. galloprovincialis* (Santarem et al., 1994), *R. philippinarum* (Soudant et al., 2004) и ряда других видов показали различную сезонную динамику, что, вероятно, связано как с видовыми особенностями, так и различиями в температурном режиме и иными параметрами среды.

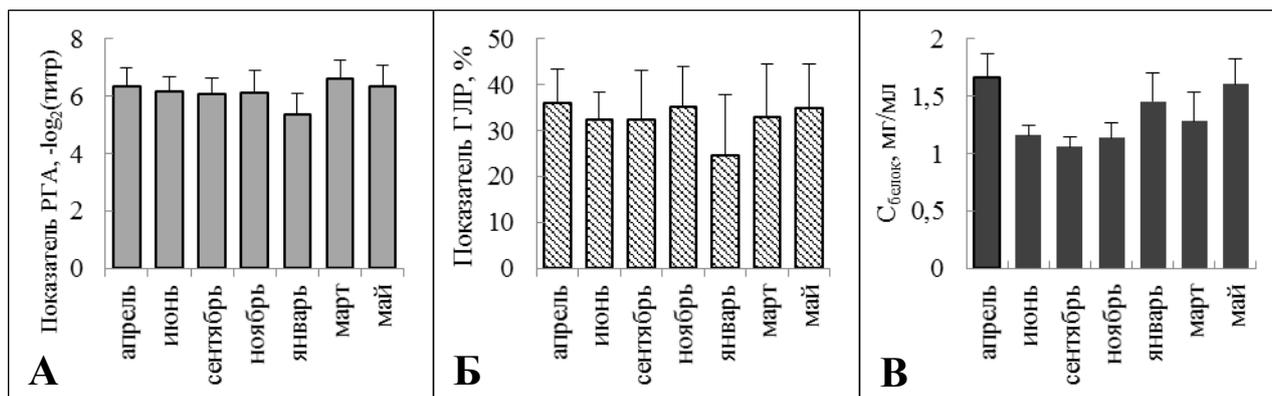


Рисунок 1. Сезонная динамика гуморальных показателей плазмы гемолимфы *M. kurilensis* из залива Восток: А – реакции гемагглютинации (РГА), Б – гемолитической реакции (ГЛР), В – общей концентрации белка (C_p), представленных в виде средних значений с 95 % ДИ.

Анализ данных, полученных методом электрофореза по Лэммли, для всей совокупности образцов ($n = 276$) выявил 15 белковых фракций, среди которых преобладающей была P55, а значимые вариации в течение года (тест Краскела–Уоллиса, $p < 0,001$) выявлены для пяти других: P124, P107, P48, P41 и P36. Их динамики имели индивидуальный характер и не были связаны со значимыми физиологическими событиями, такими как нерест, и в большинстве случаев не коррелировали с параметрами среды, за исключением P107 (отрицательная корреляция с соленостью воды, $R = -0,38$) и P36 ($R = -0,33$ в случае температуры и $R = 0,34$ в случае солености). Анализ зависимостей между иммунными показателями и фракциями белков выявил положительную корреляцию между РГА и P19 ($R = 0,38$ для всех образцов, $n = 276$), с более высокими значениями в июне ($R = 0,55$, $n = 85$) и сентябре ($R = 0,52$, $n = 31$). Фракция P19 по молекулярной массе соответствует обнаруженному нами и описанному ниже белку MkC1qDC с выраженными агглютинирующими свойствами (Grinchenko et al., 2021a, 2021b).

Таким образом, наиболее устойчивые значения исследованных показателей (РГА, ГЛР, C_p и подавляющего большинства белковых фракций плазмы) были характерны для летне-осеннего периода, в который были проведены все последующие работы.

Стимуляция гуморальных факторов гемолимфы *M. kurilensis* в ответ на введение инактивированных бактерий. Предварительный отбор модиолусов в итоге обеспечил однородность исходных показателей до введения инъекций бактерий (критерий Фридмана, $p > 0,05$) по всем исследованным параметрам, что повысило валидность результатов, полученных для сравнительно небольших выборок ($n = 16$) для каждой временной точки, а также дало уверенность в том, что выявленная динамика была типичной, и результаты не были искажены показателями особей с заведомо аномальными значениями. Введение стерильной морской воды не вызывало изменений состояния моллюсков в период от 3 до 336 ч (парный критерий Вилкоксона, $p > 0,05$) ни по одному из параметров. У модиолусов, которым вводили термически инактивированных бактерий *S. aureus*, повышение всех показателей происходило с первых часов наблюдения (рис. 2), причем для ГЛР и C_p высокие

значения сохранялись до 24 ч, в то время как для РГА – вплоть до 168 ч (парный критерий Вилкоксона, $p < 0,05$). Столь быстрый гуморальный ответ является характерным для *Bivalvia* и описан во многих работах, в том числе с использованием *S. aureus* (Chellaram et al., 2004; Romanenko et al., 2008).

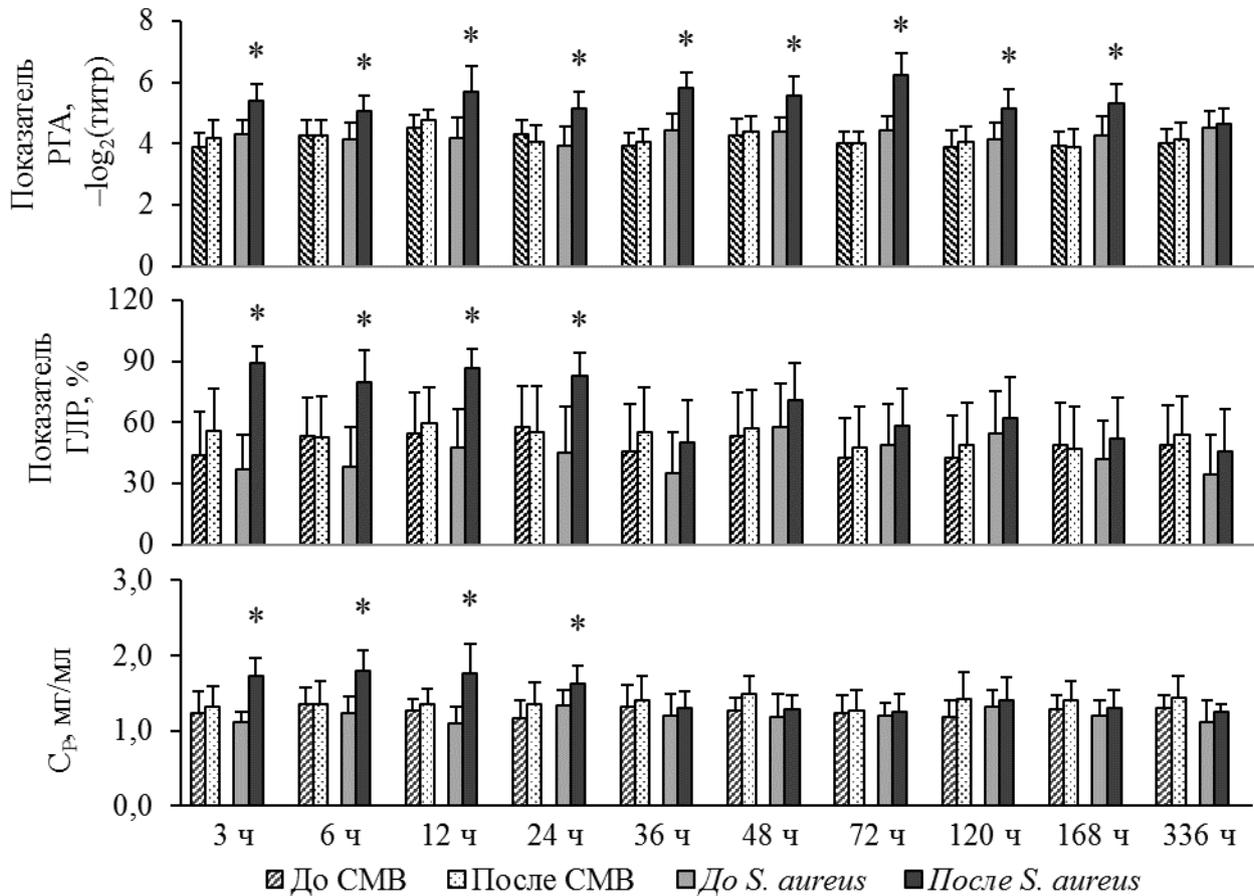


Рисунок 2. Показатели реакции гемагглютинации (РГА), гемолитической реакции (ГЛР) и концентрации общего белка в плазме (C_p) до и после введения стерильной морской воды (СМВ) или суспензии *S. aureus*, представленные в виде средних значений с 95 % ДИ; * – различия до и после введения значимы при $p < 0,05$.

Корреляция между изменениями (разностями) показателей до и после введения бактерий, отражающая взаимосвязь параметров в динамике иммунного ответа, была обнаружена в случае ГЛР и фагоцитарной активности (Grinchenko et al., 2015) с усилением в период активного клеточного ответа (3–48 ч, $n = 96$, $R = -0,54$). Это может означать, что они работают по компенсаторному принципу, то есть изменение фагоцитарной активности гемоцитов может быть скомпенсировано литическими факторами плазмы и/или наоборот.

Таким образом, было выявлено несколько стадий в динамике иммунного ответа *M. kurilensis* на заражение термически инактивированными бактериями *S. aureus*: индукторная – в первые 3 ч, эффекторная – в период 3–24 ч и фаза восстановления – 36–72 ч, каждая из которых подробно рассмотрена в опубликованной нами статье (Grinchenko et al., 2015).

В целом, можно заключить, что все изученные в данном случае показатели (РГА, ГЛР и C_p) оказались чувствительными к импульсному воздействию путем стимуляции иммунного

ответа бактериями, что подтверждает их перспективность в качестве инструмента оценки физиологического состояния моллюсков.

Чувствительность гуморальных показателей гемолимфы *M. kurilensis* к антропогенному стрессу. В ряде работ показано, что разные виды загрязнений могут изменять иммунное состояние моллюсков. При этом оказываемый эффект зависит как от вида организма, так и от типа поллютанта и его концентрации, но в большинстве случаев низкий уровень загрязнения производит иммуностимулирующий эффект, а высокие концентрации оказывают подавляющее действие (Coles et al., 1995; Pipe, Coles, 1995; Pipe et al., 1999). В Спортивной гавани Амурского залива были неоднократно зафиксированы значительная степень антропогенной нагрузки и превышение ПДК Pb, Cu, Cd, Zn, Ni и других металлов, пестицида ДДТ, нефтеуглеводородов в донных осадках (Олейник и др., 2004, Ващенко и др., 2010) и различных микроорганизмов (Бойченко и др., 2009). Все это в совокупности неблагоприятно сказывалось на состоянии некоторых гидробионтов (Жадан и др., 2003; Ващенко и др., 2005; Маркина, 2008), и, в том числе, влияло на сперматогенез *M. kurilensis* (Yurchenko, Vaschenko, 2010).

Сравнительный анализ гуморальных показателей гемолимфы *M. kurilensis* из импактной (Спортивня гавань) и условно фоновой (зал. Восток) акваторий выявил достоверное снижение литической активности плазмы и общего содержания белка в ней у модиолусов из импактной акватории (рис. 3). Это согласуется с результатами для *Crassostrea virginica* (Chu, Peyre, 1989) и *R. philippinarum* (Allam et al., 2000). Показатели реакции гемагглютинации у модиолусов из импактной и условно фоновой акваторий достоверно не различались, что ранее было показано для устриц *C. gigas* из пяти различных акваторий (Olafsen et al., 1993). Среди белковых фракций чувствительными к загрязнению оказались лишь три: P55, P78 и P124 (рис. 3).

Проведенный нами корреляционный анализ зависимости между показателями активности гуморальных факторов гемолимфы и показателями гистопатологических изменений у *M. kurilensis* из разных акваторий выявил некоторые взаимосвязи, различные для разных акваторий (Kumeiko et al., 2018). При этом выраженность корреляций была выше в случае Спортивной гавани, что, по всей видимости, объясняется бóльшим числом и тяжестью гистопатологических изменений, выявленных у животных из этой акватории (Kumeiko et al., 2018). Так, например, гипервакуолизация клеток пищеварительных трубочек у модиолусов из Спортивной гавани имела умеренную обратную связь с ГЛР ($R = -0,60$, $n = 26$) и с C_p ($R = -0,40$, $n = 26$), тогда как у животных из залива Восток такая зависимость отсутствовала. В целом, наибольшее число корреляций выявлено между ГЛР и различными типами гистопатологий, хотя для РГА и C_p такие связи также были выявлены, как и в отдельных случаях для P55 и P78. Кроме того, показана связь ГЛР и C_p с комплексными гистопатологическими индексами, более полно отражающими общее физиологическое состояние моллюсков (Kumeiko et al., 2018).

Таким образом, чувствительные к антропогенному воздействию и коррелирующие с гистопатологическими изменениями параметры ГЛР, С_Р, P55 и P78, а также достоверно различающийся между акваториями уровень P124, наряду с клеточными иммунными показателями и гистопатологическими индексами были взяты за основу разработанного нами комплексного показателя – интегрального индекса здоровья, наиболее полно отражающего физиологическое состояние моллюсков, концепция которого подробно изложена в опубликованной нами статье (Kumeiko et al., 2018).

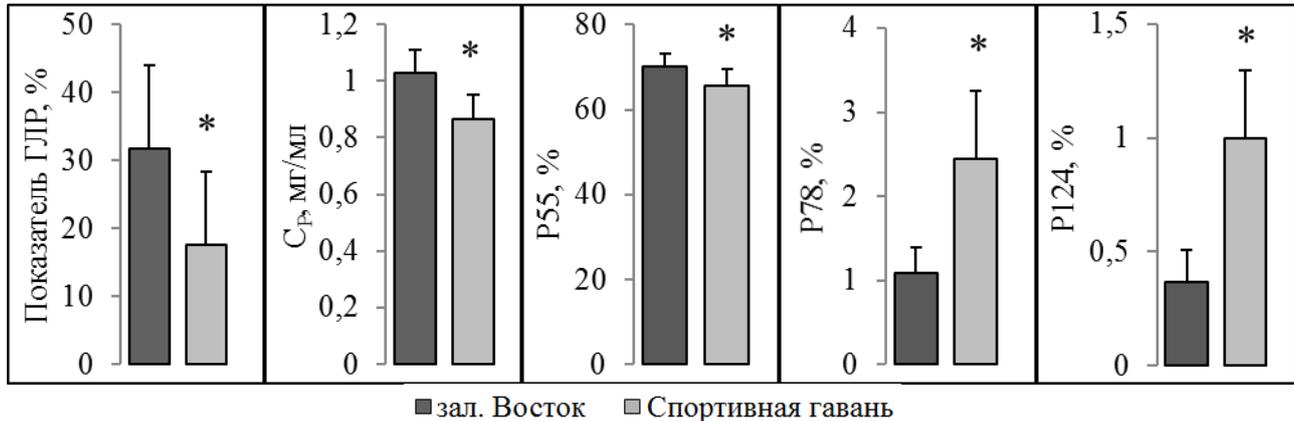


Рисунок 3. Показатели гемолитической реакции (ГЛР), концентрации общего белка (С_Р) и содержания белковых фракций P55, P78 и P124 плазмы гемолимфы *M. kurilensis* из условно фоновой (залив Восток) и импактной (Спортивная гавань Амурского залива) акваторий, представленные в виде средних значений с 95 % ДИ; * – различия значимы при $p < 0,05$.

Новый белок-агглютинин гемолимфы *M. kurilensis* (MkC1qDC) с высоким аффинитетом к гликанам на основе кислых галактанов и маннанов. Скрининг спектра углеводных специфичностей агглютининов плазмы гемолимфы *M. kurilensis* с помощью ИРГА показал отсутствие значимых различий между взятыми из разных акваторий в различное время особями и наибольшую ингибирующую способность муцинов, которые из-за своего сложного углеводного состава классически используются в качестве позитивного контроля в ИРГА (Tunkijjanukij, Olafsen, 1998; Suzuki et al., 2012), а также D-галактуроновой, D-глюкуроновой и сиаловой кислот. В работах с близким атлантическим видом *M. modiolus* также показана высокая специфичность агглютининов к сиаловой кислоте (Tunkijjanukij et al., 1997, 1998). Среди других углеводов, для которых у нашего и атлантического видов были выявлены перекрытия в специфичности агглютининов, можно отметить N-ацетил-D-галактозамин, D-(-)-рибозу, DL-арабинозу, D-(+)-раффинозу, D-(+)-ксилозу и лактозу (Tunkijjanukij et al., 1997). Однако ряд использованных нами углеводов выявил специфичность, отсутствующую у *M. modiolus*, с возрастанием ингибирующей активности у *M. kurilensis* в ряду: L-(-)-сорбоза, D-(+)-фукоза, D-(+)-галактоза, D-(+)-манноза, D-глюкоза, N-ацетил-D-глюкозамин, D-глюкуроновая кислота, что указывает на наличие новых углевод-распознающих белков в плазме *M. kurilensis*.

Дальнейшая работа позволила выявить новый углевод-связывающий белок плазмы *M. kurilensis* (MkC1qDC), для которого была разработана и оптимизирована схема

выделения, включающая первичное грубое фракционирование плазмы растворами сульфата аммония со степенями насыщения 60 % и 85 % и тонкую очистку аффинной хроматографией с использованием сефарозы с иммобилизованным полисахаридом – пектином, имеющим полигалактуронид в качестве основной структуры (рис. 4). При этом было обнаружено, что активность MkC1qDC зависит от присутствия бивалентных катионов (Ca^{2+}), его изоэлектрическая точка $\text{pI} = 5,2$, а молекулярная масса при обработке восстанавливающими агентами (меркаптоэтанолом, дитиотреитолом) составляет 19 кДа (Grinchenko et al., 2021b).

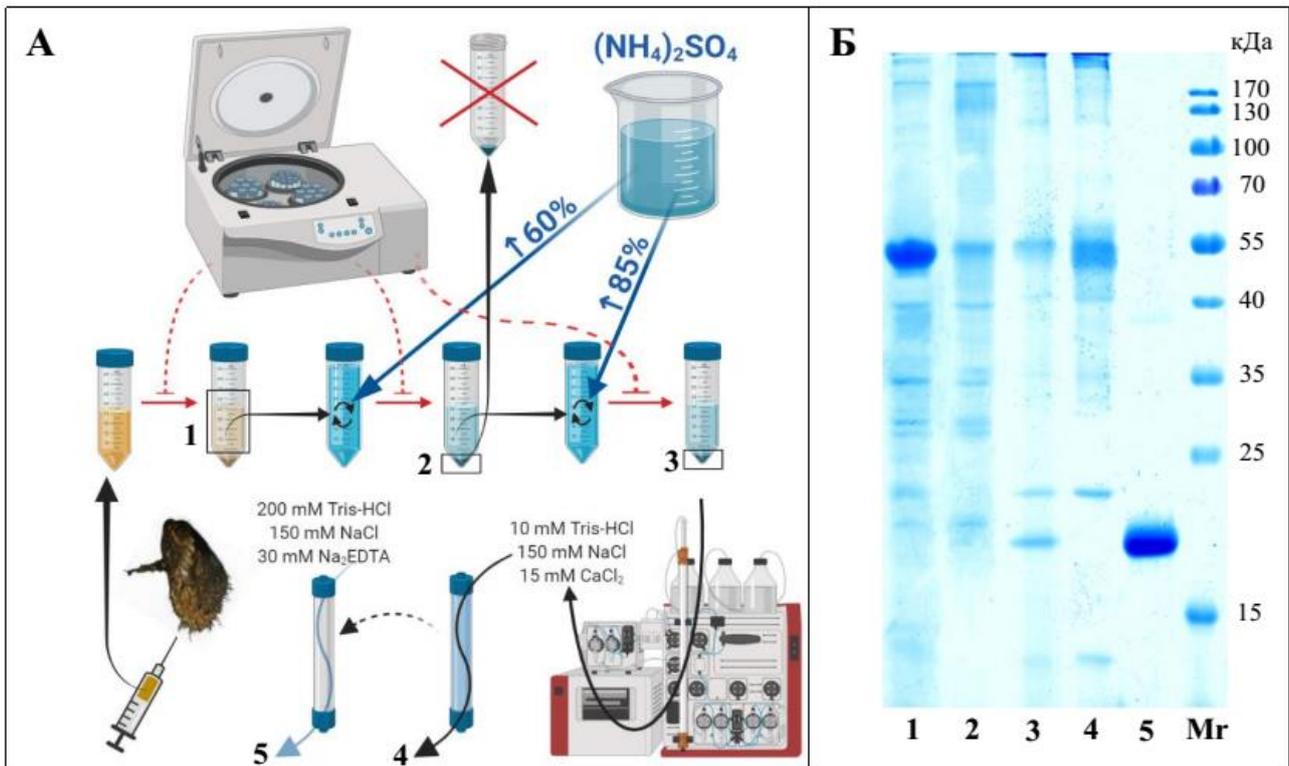


Рисунок 4. Этапы выделения белка MkC1qDC. А – общая схема выделения; Б – электрофореграмма с образцами различных этапов выделения белка MkC1qDC. 1 – плазма гемолимфы *M. kurilensis*; 2 – образец после высаливания плазмы раствором СА со степенью насыщения 60 %; 3 – образец после второй ступени высаливания с доведением насыщения раствора СА до 85 %; 4 – образец белков, не связавшихся с носителем в аффинной хроматографии; 5 – образец после аффинной хроматографии, элюированный с носителя раствором, содержащим ЭДТА; Mr – стандарты молекулярных масс.

Анализ рН-зависимости MkC1qDC показал, что максимальную агглютинирующую активность белок сохраняет после 1 ч инкубации в диапазоне рН 7–8. Агглютинирующая активность несколько снижалась при повышении рН до 9 и совсем исчезала при рН 10. Слабокислая и кислая среда (рН 3–6) незначительно влияли на активность белка. Агглютинирующая активность MkC1qDC не менялась при инкубировании его в течение 1 ч при температурах 0–40 °С, но незначительно снижалась при 50 °С и совершенно исчезала при 60 °С и выше.

Среди 23 проверенных методом ИРГА моносахаридов ингибирующую активность показали лишь 6 из них (IC_{50}): сиаловая кислота (3,75 мМ, или 1,16 мг/мл), D-глюкуроновая

кислота (7,5 мМ, или 1,46 мг/мл), D-галактуроновая кислота (7,5 мМ, или 1,46 мг/мл), являющиеся основой центральной цепи пектинов, галактоза (30 мМ, или 5,4 мг/мл), ее эпимер гулоза (15 мМ, или 2,7 мг/мл) и дезоксигалактоза (7,5 мМ, или 1,23 мг/мл). Манноза не проявила ингибирующей активности, в отличие от ее димера маннобиозы (15 мМ, или 5,13 мг/мл) и лактозы (7,5 мМ, или 2,7 мг/мл), в состав которой входит галактоза. Полисахариды, являющиеся компонентами ПАМП, такие как маннан из *S. cerevisiae*, липополисахарид из *E. coli* и пептидогликан из *S. aureus*, а также муцин типа II из желудка свиньи, имеющий в составе терминально расположенную сиаловую кислоту, имели гораздо более высокую ингибирующую способность с IC₅₀ в диапазоне 101–493 мкг/мл. Однако наибольший аффинитет MkC1qDC проявил в отношении полисахаридов с кислыми производными маннозы и галактозы в основе, таким как пектин (1,6 мкг/мл), κ-каррагинан (0,66 мкг/мл), фукоидан (0,62 мкг/мл) и альгинат (0,30 мкг/мл).

В результате нескольких секвенирований по методу Эдмана N-концевого фрагмента MkC1qDC были получены пептидные последовательности длиной от 13 до 41 аминокислотных остатков. Однако анализ этих фрагментов с помощью программы BLAST не дал значимых совпадений ни по одной из интегрированных баз. *De novo* сборка на основе проведенной масс-спектрометрии позволила получить полную аминокислотную последовательность MkC1qDC, которая показала высокую гомологию с C1qDC-белками других представителей Bivalvia (рис. 5). Данная группа является обширным мультигенным семейством паттерн-распознающих рецепторов с выраженными защитными функциями и наибольшей представленностью у Bivalvia (Gestal et al. 2010; Gerdol et al. 2011; Gerdol et al., 2015b; Mun et al., 2017; Gerdol et al., 2019). Однако для исследованных C1qDC-белков описана специфичность только к ПАМП различного строения, таким как маннаны, липополисахариды, протеогликаны, poly I:C и глюканы (Wang et al., 2012a; Jiang et al., 2015; Wang et al., 2015a), а также сиаловой кислоте (Zhang et al., 2008; He et al., 2011; Li et al., 2011; Yang et al., 2012). Максимальная специфичность MkC1qDC к гликанам, обогащенным кислыми галактанами и маннанами, предположительно может быть связана с представленностью подобных углеводов в клеточных стенках микроводорослей, которые имеют очевидную кормовую роль, а также могут быть инвазивными и инициировать некоторые процессы патогенности, что ранее уже было показано для *M. kurilensis* и *Coccomyxa parasitica* (Sokolnikova et al., 2016).

Таким образом, в ходе изучения активности агглютининов плазмы *M. kurilensis* была выявлена ранее не отмеченная для близкого вида *M. modiolus* специфичность к уроновым кислотам, дальнейшее исследование которой привело к обнаружению нового углевод-распознающего белка, имеющего структурную гомологию с C1qDC-белками других моллюсков, уникальный набор углеводной специфичности, а также относительно широкий диапазон устойчивости к pH и температурам до 50 °C.

пользу чего говорит его молекулярная масса порядка 40 кДа, увеличение его при хранении и исчезновение компонента при обработке белка дитиотреитолом.

Иммуногистохимический анализ показал локализацию белка MkC1qDC в гемоцитах (рис. 6В–Е), причем наибольшее его содержание было отмечено в базофильных гранулоцитах и несколько меньшее – в эозинофильных гранулоцитах. Вероятно, гемоциты являются основным местом синтеза MkC1qDC, как и для многих других гуморальных защитных факторов двустворчатых моллюсков, включая лектины (Tunkijjanukij, Olafsen, 1998; Mitta et al., 2000c; Kim et al., 2006; Tasumi, Vasta, 2007; Balseiro et al., 2011). Однако во многих работах с растворимыми паттерн-распознающими рецепторами для них показана высокая транскрипционная активность и в других местах, особенно в органах, имеющих наибольшую вероятность проникновения патогенов, таких как мантия, жабры, кишечник, пищеварительная железа (ПВЖ) (Yang et al., 2011; Vasta et al., 2012a; Gerdol et al., 2015b).

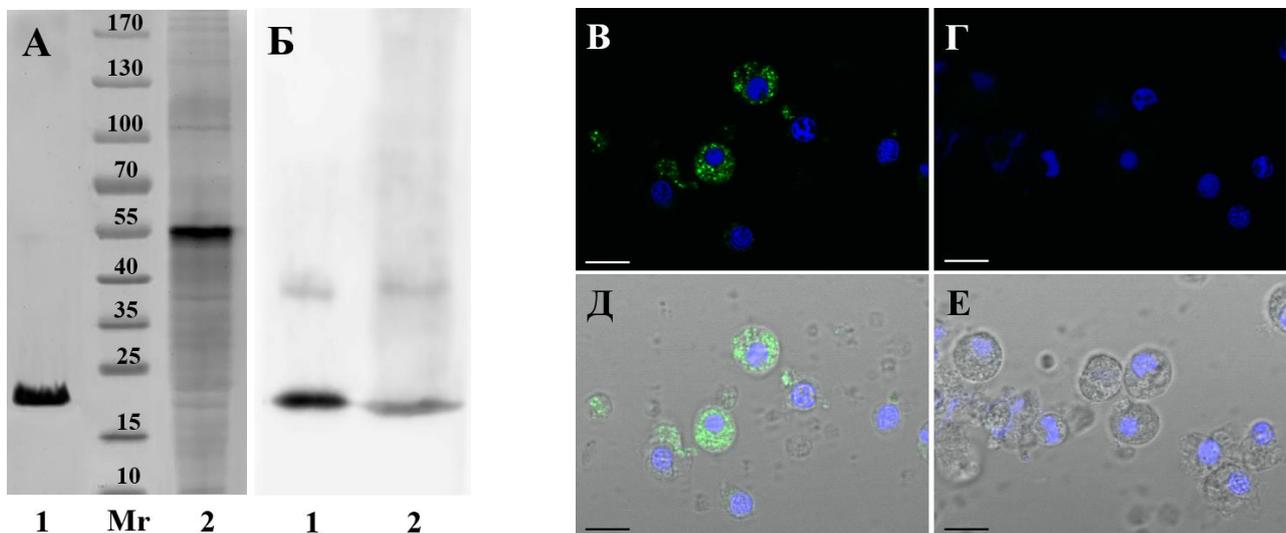


Рисунок 6. Выявление MkC1qDC в компонентах гемолимфы *M. kurilensis*: в плазме (А, Б) и в гемоцитах (В–Е). А – электрофорез; Б – Вестерн блоттинг (1 – очищенный MkC1qDC; 2 – плазма; Mr – стандарты молекулярных масс); В, Г – флуоресценция; Д, Е – наложение фазового контраста и флуоресценции; В, Д – полная обработка первичными и вторичными антителами; Г, Е – контроль без первичных антител (MkC1qDC окрашен Alexa Fluor-488 – зеленый цвет), ядра окрашены DAPI – синий цвет, масштабный отрезок – 10 мкм).

Иммуногистохимический анализ парафиновых срезов показал локализацию белка MkC1qD в основном также в гемоцитах, в стенках гемальных синусов и каналов, а также в интерстициальном пространстве, включающем внеклеточные волокнистые структуры (рис. 7). Вероятно, что и во внеклеточном пространстве органов, показавших позитивную реакцию, MkC1qDC играет роль паттерн-распознающего рецептора, обеспечивая тканевую защиту от патогенов, что особенно хорошо прослеживается в случае края мантии, перикарда, бронхиальных синусов, соединительнотканых образований ПВЖ, а также интерстициальные ткани почек и гонад (рис. 7).

Таким образом, выявленный MkC1qDC как гуморальный фактор иммунитета, способный агглютинировать и подавлять рост грам(+) и грам(–) бактерий, наиболее вероятно

исходно синтезируется в гемоцитах, а в тканях различных органов представлен главным образом в структурах, связанных с гемальной системой и интерстициальным компартментом.

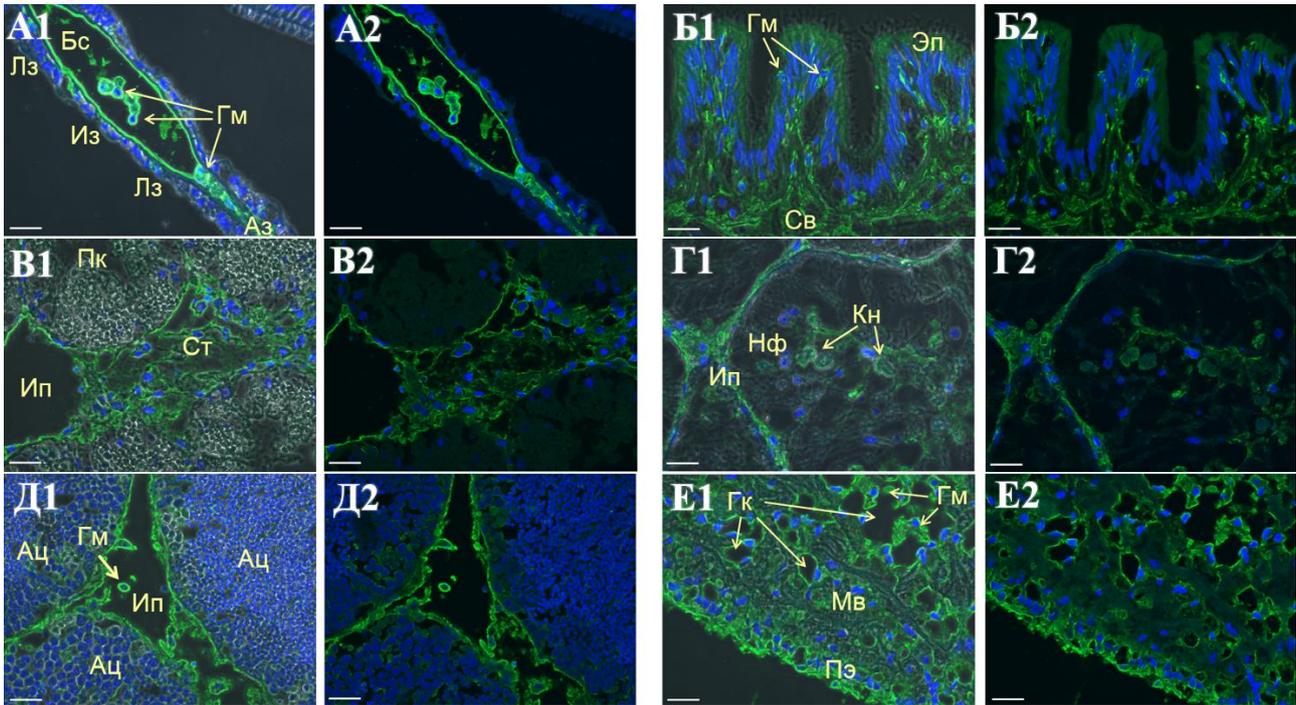


Рисунок 7. Выявление MkC1qDC (зеленый цвет) в органах *M. kurilensis*. Ядра докрашены DAPI (синий цвет). А – жабры; Б – край мантии; В – пищеварительная железа; Г – почка; Д – гонада; Е – перикард. 1 – наложение фазового контраста и флуоресценции; 2 – флуоресценция. Аз – абфронтальная зона; Ац – ацинус; Бс – бронхиальный синус; Гк – гемальные каналы; Гм – гемоциты; Из – интермедиальная зона; Ип – интерстициальное пространство; Кн – конкреции; Лз – латеральная зона; Мв – мышечные волокна; Нф – нефроциты; Пк – пищеварительный каналец; Пэ – перикардиальный эпителий; Св – соединительнотканьные волокна; Ст – соединительная ткань; Эп – эпителий. Масштабный отрезок – 20 мкм.

Биомедицинский потенциал углевод-связывающего белка MkC1qDC. Результаты МТТ-теста показали чувствительность всех трех использованных опухолевых линий, особенно аденокарцином: для HeLa CCL-2 $IC_{50MkC1qDC} = 1,77$ мкМ, для MDA-MB-231 – 3,48 мкМ. Глиобластома U87 MG была несколько устойчивее с $IC_{50MkC1qDC} = 7,89$ мкМ. При этом исследуемый белок не оказывал воздействия на неопухолевые клетки hTERT RPE-1. Сиало-специфичный лектин HddSBL моллюска *H. discus*, который был определен как представитель семейства C1qDC белков (Ghosh et al., 2017), также проявлял наибольшую активность в отношении опухолей эпителиального происхождения (Yang et al., 2014).

Схожие результаты показала витальная окраска клеток комбинацией йодистого пропидия и аннексина V (рис. 8). Для hTERT RPE-1 достоверных изменений выявлено не было ($p > 0,05$), тогда как для опухолевых клеток основным механизмом клеточной гибели был некроз: доля окрашенных йодистым пропидием клеток при воздействии 5 мкМ MkC1qDC возрастала для разных клеточных линий до 74,4–92,6 % в сравнении с контролем 6,8–25,6 % ($p < 0,05$ во всех случаях). Значимое повышение содержания еще и

апоптотических клеток, окрашенных только аннексином V, отмечено лишь для клеток глиобластомы U87 MG: с $4,6 \pm 2,1$ % до $11,1 \pm 3,5$ % ($p < 0,05$). Вероятно, что механизмы воздействия на различные типы клеточных линий могут несколько отличаться. Например, для ряда лектинов показаны несколько возможных путей запуска клеточной гибели (Rabelo et al., 2012; Nascimento-Neto et al., 2018).

Окрашивание клеток конъюгатом MkC1qDC-FITC также подтверждает описанные выше результаты. Наиболее интенсивная окраска крупными конгломератами белка была отмечена для клеток HeLa CCL-2 (рис. 9А), причем не только на поверхности клеток, но и в непосредственной близости к ним. Клетки другой аденокарциномы, MDA-MB-231, окрашивались меньшими по размеру конгломератами, но несколько более таргетно по отношению к границам клеток (рис. 9Б). Наиболее выражено MkC1qDC-FITC выявлял границы клеток в случае глиобластомы U87 MG (рис. 9В). Препараты клеток hTERT RPE-1 также окрасились MkC1qDC-FITC, однако в меньшей степени и в данном случае белок был равномерно распределен в виде мелких зерен по всей поверхности лунки независимо от наличия или отсутствия клеток (рис. 9Г). Прилежащие к клеткам HeLa CCL-2 окрашенные участки, а также окрашенные гранулы на препаратах hTERT RPE-1, предположительно, могут являться сформированными ими компонентами гликокаликса и/или внеклеточного матрикса, обогащенного целевыми для MkC1qDC углеводами.

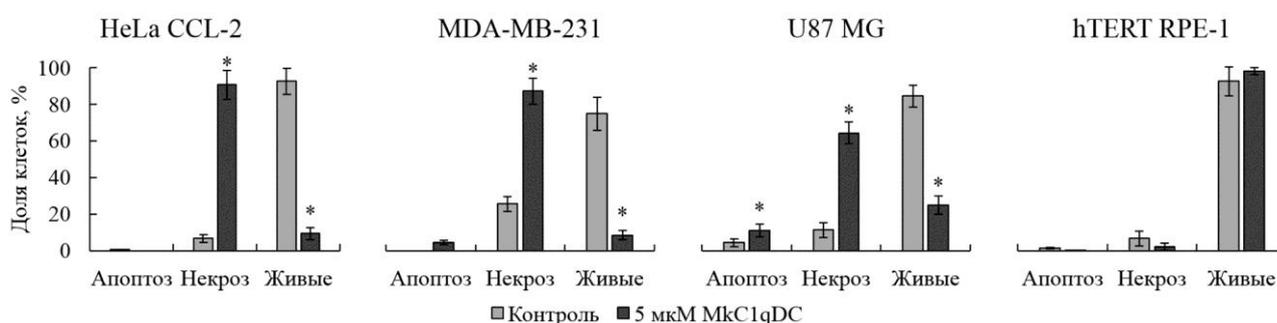


Рисунок 8. Результат оценки механизма клеточной гибели при воздействии MkC1qDC в концентрации 5 мкМ с использованием витальной окраски комбинацией йодистого пропидия и аннексина V.

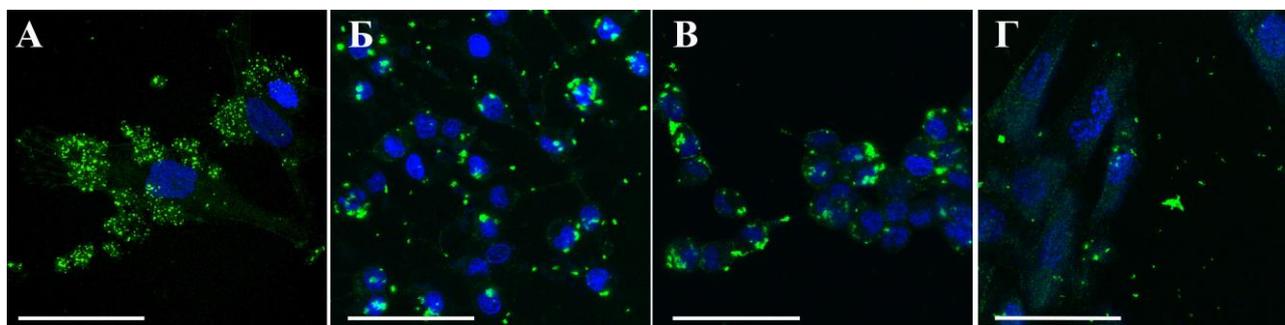


Рисунок 9. Окрашка клеток FITC-меченным белком MkC1qDC (зеленый цвет), ядра окрашены Hoechst 33342 (синий цвет). А – клетки линии HeLa CCL-2. Б – клетки линии MDA-MB-231. В – клетки линии U87 MG. Г – клетки линии hTERT RPE-1. Масштабный отрезок – 50 мкм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе проведен комплексный анализ агглютинирующей и литической активности гемолимфы широко распространенного в дальневосточных морях представителя двустворчатых моллюсков *M. kurilensis*, что позволило выявить и идентифицировать новый углевод-распознающий белок MkC1qDC, а также разработать схему его эффективного выделения. Показана защитная роль этого белка, проявляющаяся в агглютинации и подавлении роста грам(+) и грам(-) бактерий. Установлена структурная гомология MkC1qDC с C1qDC-белками других *Vivalvia* и выявлена его клеточная и тканевая локализация. Внутриклеточно MkC1qDC был обнаружен только в гранулах гемоцитов, что, вероятно, указывает на основное место синтеза этого белка. В органах *M. kurilensis* MkC1qDC ассоциирован с внеклеточными структурами гемальной системы и интерстициального компартмента. Для MkC1qDC характерен уникальный набор углеводной специфичности, включающий полисахариды на основе кислых галактанов и маннанов, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, сиаловую кислоту и ряд других углеводов с менее выраженной специфичностью. Эти свойства наряду со способностью связывать клеточные поверхности и проявлять цитотоксичность в отношении клеточных линий аденокарцином и глиобластомы с преобладающим некротическим механизмом их гибели, а также отсутствие влияния на клетки неопухолевой линии делают MkC1qDC перспективным инструментом биотехнологии.

Проведенная оптимизация условий оценки активности агглютинирующих и литических факторов плазмы гемолимфы *M. kurilensis* позволяет валидно оценивать вариативность данных иммунных показателей и дифференцировать животных, подверженных различным воздействиям. Анализ белкового профиля плазмы *M. kurilensis* показал снижение общей концентрации белков в летне-осенний период и наличие 15 фракций полипептидов с массами от 16 кДа до 196 кДа (P16-P196), среди которых мажорной является P55, а значимые колебания в течение года характерны для P124, P107, P48, P41 и P36. При этом естественные границы исследованных показателей выявляют широкие пределы вариативности и в большинстве случаев метастабильные колебания в течение года.

Исследование динамики гуморального ответа *M. kurilensis* на введение термически инактивированных *S. aureus* выявило значимое повышение концентрации белков плазмы, а также ее литической и агглютинирующей активности начиная с 3 ч, которое сохраняется в течение 1 суток для первых двух показателей и 7 суток для третьего. Сравнение выборок из импактной акватории Спортивной гавани Амурского залива и условно фонового залива Восток выявило чувствительность к антропогенной нагрузке таких показателей как общая концентрация белков плазмы *M. kurilensis*, содержания фракций полипептидов P124, P55 и P78 и литической активности плазмы. Показана коррелятивная связь этих показателей с показателями гистопатологических изменений почек и пищеварительной железы.

ВЫВОДЫ

1. Агглютинирующая активность, а также общая концентрация белков, литическая активность и содержание фракций полипептидов P124, P55, P78 плазмы гемолимфы двустворчатого моллюска *M. kurilensis* имеют метастабильный характер динамики в течение года и зависят от физиологического состояния моллюсков при хроническом антропогенном стрессе и остром иммунном ответе.

2. Анализ агглютинирующей активности плазмы гемолимфы *M. kurilensis* показал наличие нового углевод-распознающего белка MkC1qDC с максимальной специфичностью в отношении кислых галактанов и маннанов, менее выраженной специфичностью к углеводам патоген-ассоциированных молекулярных паттернов и муцину, а также моно- и дисахаридам с убыванием в следующем ряду: сиаловая кислота → (L-гулоза, D-галактуроновая и D-глюкуроновая кислоты) → (D-лактоза, 2-деокси-D-галактоза) → (D-галактоза, 2 α -маннобиоза).

3. Установлена первичная структура белка MkC1qDC и его гомология с C1q-домен-содержащими белками других *Bivalvia*.

4. Защитная роль MkC1qDC проявляется в агглютинации и подавлении роста грам(+) и грам(-) бактерий с убыванием степени воздействия в ряду: *Pseudoalteromonas* sp. → *Bacillus subtilis* → *Reugeteria* sp. → *Staphylococcus aureus* → *Escherichia coli* → *Vibrio* sp.

5. Показано, что синтез и накопление MkC1qDC происходит в гранулярных гемоцитах *M. kurilensis*, в то время как во внутренних органах он ассоциирован с внеклеточными структурами гемальной системы и интерстициального компартмента.

6. Белок MkC1qDC способен распознавать клетки аденокарцином (HeLa CCL-2, MDA-MB-231) и глиобластомы (U87 MG), проявляет в отношении них цитотоксические свойства с преобладающим некротическим механизмом гибели, не влияя при этом на неопухолевые эпителиальные клетки линии hTERT RPE-1. Полученные данные свидетельствуют о биомедицинском потенциале применения MkC1qDC для разработки систем онкодиагностики и таргетной доставки противоопухолевых препаратов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. **Grinchenko A.V.**, Sokolnikova Y.N., Korneiko D.K., Kumeiko V.V. Dynamics of the immune response of the horse mussel *Modiolus kurilensis* (Bernard, 1983) following challenge with heat-inactivated bacteria // Journal of Shellfish Research. 2015. Vol. 34, № 3. P. 909–917.
2. Kumeiko V.V., Sokolnikova Y.N., **Grinchenko A.V.**, Mokrina M.S., Kniazkina M.I. Immune state correlates with histopathological level and reveals molluscan health in populations of *Modiolus kurilensis* by integral health index (IHI) // Journal of Invertebrate Pathology. 2018. Vol. 154. P. 42–57.
3. **Grinchenko A.V.**, Sokolnikova Y.N., Ilyaskina D.V., Kumeiko V.V. Seasonal changes in hemolymph parameters of the bivalve *Modiolus kurilensis* Bernard, 1983 from Vostok Bay, Sea of Japan // Russian Journal of Marine Biology. 2021. Vol. 47, № 4. P. 300–311.
4. **Grinchenko A.V.**, Von Kriegsheim A., Shved N.A., Egorova A.E., Ilyaskina D.V., Karp T.D., Goncharov N.V., Petrova I.Yu. Kumeiko V.V. A novel C1q domain-containing protein isolated from the mollusk *Modiolus kurilensis* recognizing glycans enriched with acidic galactans and mannans // Marine Drugs. 2021. Vol. 19, № 12. Article No. 668.

Патенты:

1. Кумейко В.В., **Гринченко А.В.**, Сокольников Ю.Н. Способ оценки здоровья морских двустворчатых моллюсков и состояния среды их обитания: Патент № RU2571817C1. 2015.

Работы в материалах всероссийских и международных конференций:

1. **Гринченко А.В.**, Кумейко В.В. Активность агглютинирующих факторов гуморального иммунитета двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis* и *Anadara broughtoni* из некоторых акваторий Японского моря // Материалы Всероссийской научной школы для молодежи "Перспективы развития инноваций в биологии". Владивосток: Дальневосточный федеральный университет, 2010. С. 62–64.
2. **Гринченко А.В.** Агглютинирующие факторы плазмы двустворчатых моллюсков *Modiolus kurilensis* из фоновых и импактных акваторий Японского моря // Материалы Второй Всероссийской научной молодежной конференции-школы "Проблемы экологии морского шельфа". Владивосток: Дальневосточный федеральный университет, 2011. С. 27–31.
3. **Grinchenko A.V.**, Kumeiko V.V. Activity of hemolymph agglutination factors of *Modiolus* (Mollusca: Bivalvia) from different water areas of the Sea of Japan // Book of abstracts "16th EAFFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish". Tampere: "Nykyraino" Press, 2013. P. 254.
4. **Grinchenko A.V.**, Mokrina M.S., Sokolnikova Y.N., Kumeiko V.V. The immune parameters displaying the physiological state of bivalve mollusks from impacted and non-impacted water areas // Abstracts of the International Conference "Unique Marine Ecosystems: Modern Technologies of Exploration and Conservation for Future Generations". Vladivostok: Far Eastern Federal University, 2016. P. 50.
5. **Гринченко А.В.**, Сокольников Ю.Н., Мокрина М.С. Способ оценки здоровья морских гидробионтов и состояния среды их обитания // Материалы Первой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Экология и управление природопользованием". Томск: Томский государственный университет, 2016. С. 56–59.
6. **Grinchenko A.V.**, Shved N.A., Malykin G.V., Egorova A.E., Kumeiko V.V. A new lectin recognizes both polyuronates and mannans isolated from Mytilidae mollusk may serve a promising tool for cancer diagnostics // Future of Biomedicine 2017 Conference. Vladivostok: Far Eastern Federal University, 2017. P. 83.

ГРИНЧЕНКО
АНДРЕЙ ВИКТОРОВИЧ

**АГГЛЮТИНИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ И НОВЫЙ БЕЛОК-АГГЛЮТИНИН M_kC1_qDC
ГЕМОЛИМФЫ ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MODIOLUS KURILENSIS*:
ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ТКАНЕВАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ И СВОЙСТВА**

1.5.22. Клеточная биология

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук