

На правах рукописи



ДУН СЯНЛИ

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ БЕЛКОВ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ РЫБ В
ДИНАМИКЕ В ОТВЕТ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИИ**

03.02.06 Ихтиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Калининград, 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский государственный гидрометеорологический университет» (ФГБОУ ВО «РГГМУ»)

Научный руководитель: доктор биологических наук

Юлия Николаевна Лукина

Научный консультант: кандидат биологических наук

Василий Александрович Голотин

Официальные оппоненты:

Светлана Александровна Мурзина, доктор биологических наук, институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ИБ КарНЦ РАН), заведующая лабораторией экологической биохимии

Александр Анатольевич Махров, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр комплексного изучения Арктики им. академика Н.П. Лаверова Уральского отделения Российской академии наук.

Защита состоится 17 декабря 2021 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета Д307.007.01 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Калининградский государственный технический университет» по адресу: 236022, Калининград, Советский проспект, д.1, ауд. 255/256.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет».

<http://www.klgtu.ru/science/diss/soviets/dissertatsii/>

Е-mail: olga.anohina@klgtu.ru

Факс: 8(4012)99-53-46

Автореферат разослан «17» октября 2021 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат технических наук



Анохина Ольга Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследований. В условиях нарастающей антропогенной нагрузки на водные экосистемы роль аквакультуры в сохранении рыбных ресурсов становится всё более значимой, особенно в странах, обладающих достаточным запасом морских и пресноводных водоемов, пригодных для ее развития, таких как Россия и Китай (Шилин и др., 2009).

Интенсивное развитие аквакультуры влечет проблемы, связанные с инфекционными заболеваниями рыб, которые наносят существенный вред рыбным хозяйствам и аквакультурному сектору мировой экономики в целом. В диссертационной работе эта проблема рассмотрена на примере двух важных объектов культивирования в Евразийском регионе – большого желтого горбыля (*Larimichthys crocea*) и радужной форели (*Oncorhynchus mykiss*).

Для большого желтого горбыля в индустриальных условиях опасность представляют бактериальные заболевания, возбудителями которых являются *Vibrio anguillarum* и *Vibrio harveyi*. Патогенная бактерия *Aeromonas salmonicida*, вызывает аэромоноз, который для радужной форели является наиболее распространенной инфекцией, приводящей к большим экономическим потерям. В настоящее время эти инфекции значительно ограничивают развитие их аквакультуры.

Для эффективной борьбы против подобных патогенов в настоящее время широко применяются препараты с мощным противобактериальным действием, однако их постепенное накопление в водной среде и в объектах культивирования оказывает негативное влияние на здоровье человека при употреблении в пищу рыбопродуктов, перенасыщенных антибиотиками. Чтобы минимизировать этот вред, необходима разработка экологически безопасных методов профилактики и лечения бактериальных болезней рыб. Это, в свою очередь, требует расширения знаний о фундаментальных основах противобактериального иммунитета культивируемых видов.

Данные основы включают изучение противовоспалительных белков иммунной системы рыб. В связи с малой изученностью белков иммунного

ответа у рыб, особенно у культивируемых видов, экспериментальные исследования заражения возбудителями, типичными для объектов культивирования инфекциями, являются одним из важных начальных этапов в разработке новых подходов к их лечению и профилактике. Такими белками, например, являются хемокины (CCL) и маннозные рецепторы (MRC). Эти белки выполняют ключевые функции в организме рыб: от связывания патогенов до клеточного сигналинга в различных провоспалительных процессах (East, Isacke, 2002; Zlotnik, Yoshie, 2012).

В настоящей диссертационной работе на основе новых данных по изучению активации генов белков иммунного ответа у культивируемых видов рыб на бактериальные инфекции разработаны экспериментальные модели для определения эффективности будущих новых биологически активных компонентов, укрепляющих иммунитет рыб.

Цель исследования - изучение на молекулярном уровне реакций специфического иммунного ответа приоритетных объектов аквакультуры Китая - большого желтого горбыля *L. crocea* и России - радужной форели *O. mykiss* в моделях их распространенных инфекционных заболеваний.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Установить особенности и структурно-функциональные взаимосвязи *in silico* первичных и пространственных структур белков-хемокинов CCL2, CCL3, CCL4, а также маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 у приоритетных объектов аквакультуры Китая (большого желтого горбыля) и России (радужной форели).

2. Создать *in vivo* модели вибриоза у большого желтого горбыля и аэромоноза у радужной форели в условиях аквакультуры.

3. Изучить уровни и локализацию экспрессии генов специфического иммунного ответа большого желтого горбыля на примере хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 в норме и в модели вибриоза.

4. Сравнить локализацию и уровни экспрессии генов неспецифического иммунного ответа у большого желтого горбыля и радужной форели на примере

маннозных рецепторов MRC1, MRC2 в созданных моделях инфекционных заболеваний.

Научная новизна и теоретическая значимость работы заключается в комплексном исследовании хемокинов и маннозных рецепторов.

Впервые построены *in silico* теоретические пространственные структуры белков иммунного ответа: хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 и маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 у приоритетных видов рыб, выращиваемых в условиях аквакультуры Китая (большой желтый горбыль) и России (радужная форель). Впервые созданы *in vivo* модели двух бактериальных инфекций на тепловодном и холодноводном культивируемых видах рыб, которые могут служить экспериментальной основой для апробации новых иммуномодуляторов, а также вакцин, повышающих иммунный статус объектов культивирования. Впервые установлены взаимосвязи между структурой и функцией белков иммунной системы и особенности экспрессии генов белков иммунной системы большого желтого горбыля и радужной форели в норме и при патологии в динамике

Практическая значимость. Разработанные модели вибриоза у большого желтого горбыля и аэромоноза у радужной форели могут использоваться в качестве тест-систем для оперативной диагностики этих инфекционных заболеваний рыб в промышленных условиях. Полученные данные важны при разработке рекомендаций по профилактике и терапии инфекционных болезней рыб в условиях аквакультуры с учетом экологических особенностей объектов культивирования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Хемокины CCL2, CCL3 и CCL4 большого желтого горбыля являются структурно гомологичными белками, что предполагает сходство их функциональных особенностей.

2. Первичные последовательности маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 и их 3D-модели обладают высоким уровнем идентичности у большого желтого

горбыля и радужной форели, что подтверждает высокую консервативность этих белков вне зависимости от вида рыб и среды их обитания.

3. Экспрессия генов белков-хемокинов CCL2, CCL3 и CCL4 значительно возрастает в селезенке, печени и почках у большого желтого горбыля в модели вибриоза, что свидетельствует о ключевой роли этих белков в провоспалительных реакциях.

4. Существенные различия в уровнях экспрессии генов маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 в моделях вибриоза у большого желтого горбыля и аэромоназа у радужной форели свидетельствуют об особенностях иммунного ответа у холодноводных и тепловодных видов рыб.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на международных и всероссийских конференциях: Международная студенческая научно-практическая конференция «Мы говорим на одном языке» (Санкт-Петербург, 2019 г.), Международная научно-практическая конференция «География: развитие науки и образования» (LXXIII Герценовские чтения) (Санкт-Петербург, 2020 г.), Международная научно-практическая конференция «Современные проблемы гидрометеорологии и мониторинга окружающей среды на пространстве СНГ» (Санкт-Петербург, 2020 г.), IV Всероссийская конференция и выставка «Гидрометеорология и экология: достижения и перспективы развития 2020» (Санкт-Петербург, 2020 г.), Всероссийская научная конференция «Экологическая деятельность и экологическое просвещение: региональный аспект» (Ленинградский Государственный Университет имени А.С. Пушкина) (Санкт-Петербург, 2020 г.); на расширенных семинарах экологического и океанического факультетов Российского государственного гидрометеорологического университета (2018, 2021 гг.), Ученого совета Санкт-Петербургского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ им. Л.С. Берга») (2019 г.).

Личный вклад автора. Автором обоснована тема, определены цель и задачи исследования, осуществлены сбор материала, разработка и выполнение эксперимента, выполнены статистическая и биоинформатическая обработка

данных, проведены обобщение и интерпретация результатов, формулировка выводов.

Публикации. Основные результаты работы опубликованы в 11 научных публикациях, 6 из которых входят в Science Citation Index (SCI) и перечень, рекомендованный ВАК, а также в 5 статьях и тезисах в материалах научных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, который включает 216 наименований. Диссертация изложена на 131 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц и 38 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность консультантам к.б.н. В.А. Голотину, к.б.н. М.Б. Шилину, д.б.н. Чжан Цзяньше и к.б.н. О. В. Апаликовой за помощь в планировании эксперимента и редактировании текста диссертации; д.б.н., профессору А.А. Лукину за содействие в постановке эксперимента; преподавателям Ли Джиджии и Е. Иньин за методическую помощь; д.б.н. У. Чангвэнь и д.т.н. Лу Хуацин за рекомендации при поступлении в РГГМУ и моральную поддержку во время обучения. Автор выражает признательность сотрудникам Санкт-Петербургского филиала ФГБНУ «ВНИРО» («ГосНИОРХ» им. Л.С. Берга) Д.К. Митрюшкиной, М.Н. Киселевой, Т.А. Филатовой и к.б.н. В.А. Богдановой за помощь в поиске русскоязычных статей для написания обзора литературы. Автор выражает признательность преподавателям Российского государственного гидрометеорологического университета и Чжэцзянского университета за помощь, обучение и поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Освещены вопросы организации иммунной системы рыб, молекулярные механизмы ее регуляции и ключевые функции белков иммунного ответа

(хемокинов и маннозных рецепторов. Представлены приоритетные подходы и современные методы профилактики и борьбы с инфекционными заболеваниями рыб в мировой практике. Обозначены главные задачи, стоящие при разработках новейших эффективных препаратов для иммунизации рыб. Уделено внимание вопросам современного состояния и проблемам рыбоводства в Китае и России, подводящего к постановке проблемы и выбору объектов исследования.

Глава 2. Материалы и методы исследования

В работе использованы два взаимодополняющих методических подхода: 1 - фундаментальное изучение особенностей первичных и пространственных структур белков иммунной системы рыб (хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 и маннозных рецепторов MRC1, MRC2) современными методами биоинформатики и 3D-моделирования; 2 – практическое изучение уровней экспрессии генов белков иммунной системы рыб в норме и при патологии в моделях различных бактериальных инфекций двух видов рыб.

Теоретическая часть исследования базировалась на анализе первичных последовательностей исследуемых белков, полученных экспериментальным путем, а также депонированных в геномном банке, с помощью программ SMART. 3D-модели белков построены с использованием онлайн ресурса SWISS-MODEL и Pymol.

Экспериментальную часть исследования выполняли на большом желтом горбыле и радужной форели, для заражения которых использовали бактериальные культуры *Vibrio anguillarum* (для большого желтого горбыля) и *Aeromonas salmonicida* (для радужной форели) с целью создания *in vivo* моделей заболеваний вибриоза и аэромоноза.

Фиксирование тканей производили в растворе для консервирования образцов РНК. РНК из тканей и органов выделяли с помощью реагента TRIzol RNA Isolation Reagents; кДНК синтезировали с использованием набора для синтеза кДНК (cDNA Synthesis Kit); дизайн праймеров для ПЦР и ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием программного обеспечения Primer 5.0; ПЦР в режиме реального времени (qRT-PCR) проводили с

использованием набора премиксов SYBR ExTaq. Статистическую обработку провели в программе амплификатора 7500 Real-Time PCR System (Prism® 7500).

Количество исследованного материала: 240 экз. рыб (180 экз. большого желтого горбыля и 60 экз. радужной форели). Статистический анализ различий проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Организация первичной и пространственной структур хемокинов

CCL2, CCL3, CCL4 большого желтого горбыля *L. crocea*

Кодирующая последовательность (кДНК) CCL2 (GenBank ID: MN125657) состоит из 294 пар оснований (п.о.), что соответствует 97 аминокислотным остаткам (а.о.) (рисунок 1, А). Вторым охарактеризованным нами хемокином – CCL3. Его кДНК (GenBank ID: MN125658) состоит из 309 п.о., что соответствует 102 а.о. (рисунок 1, Б). Кодирующая последовательность (кДНК) CCL4 (GenBank ID: MN125659) состоит из 276 п.о., кодирующих 91 а.о. (рисунок 1, В).

Анализ первичных последовательностей и пространственных структур исследованных хемокинов большого желтого горбыля показал, что для этих белков характерно присутствие общего функционального домена SCY (рисунок 1), который содержит 4 остатка цистеина. Эти четыре остатка цистеина образуют две дисульфидные связи, которые обеспечивают функционально необходимую конформацию хемокина. В остальной доменной структуре изученных нами хемокинов имеются некоторые различия. Так, в отличие от CCL2, CCL3 и CCL4 имеют в своей структуре трансмембранный домен. Однако, CCL2 обладает областью низкой сложности (Low complicity region), обычно эта область не несет значимых доменов.

Путем анализа первичной и третичной структур аминокислотных последовательностей белков было обнаружено, что исследованные хемокины имеют аналогичные высокоуровневые структуры, закрепленные дисульфидными связями, образованными цистеинами на свободном N-конце. В

составе молекул этих белков есть три антипараллельных β -листа, а на С-конце есть спираль, почти перпендикулярная α -листу (рисунок 1, В).

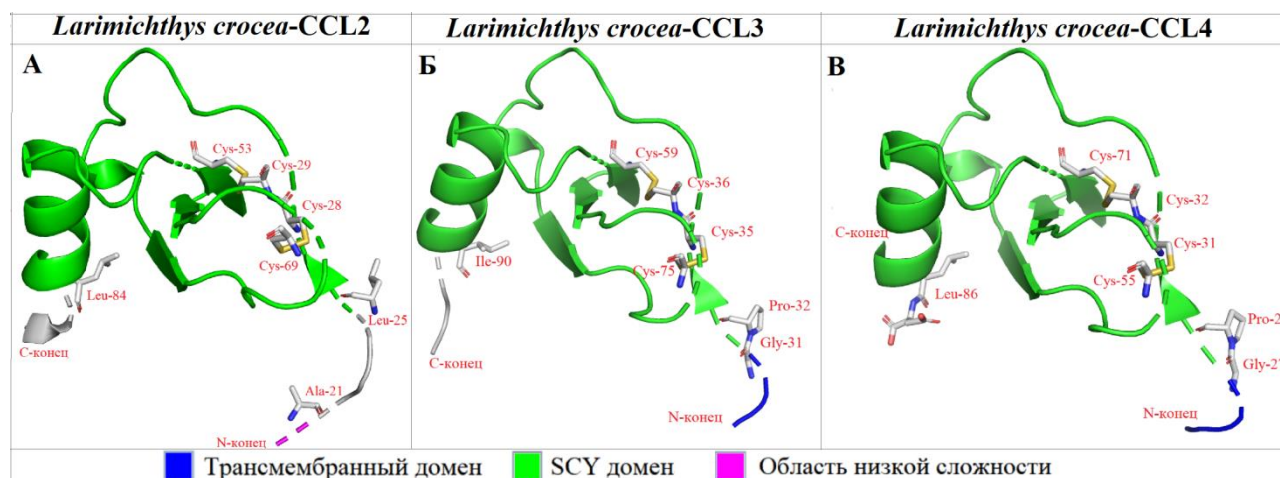


Рисунок 1 - Теоретические модели пространственных структур CCL2 (А), CCL3 (Б) и CCL4 (В) большого желтого горбыля. Отмечены критически значимые функциональные аминокислоты, цветом обозначены структурные домены

N-конец СС-хемокина может активировать рецептор и оказывать хемотаксический эффект на моноциты, Т-клетки и т.д. Аминокислотные остатки на N-конце определяют способность молекулы хемокина связываться с рецептором. α -спираль на С-конце также играет чрезвычайно важную роль во взаимодействии хемокинов с рецепторами за счет её способности прочно связываться с мукополисахаридами на поверхности тканей или клеток (Lira, Furtado, 2012).

3.2. Особенности строения маннозных рецепторов MRC1, MRC2

у большого желтого горбыля *L. crocea* и радужной форели *O. mykiss*

Кодирующая последовательность MRC1 (кДНК) большого желтого горбыля (GenBank ID: АКН05366) состоит из 4479 п.о, что соответствует 1492 а.о (рисунок 2 А). Второй охарактеризованный нами маннозный рецептор - MRC2 большого желтого горбыля. Его кДНК (GenBank ID: АКН05367) состоит из 3996 п.о., что соответствует 1331 а.о. (рисунок 2 Б). Кодирующая последовательность (кДНК) MRC1 радужной форели (GenBank ID: 110508267) состоит из 4299 п.о., что соответствует 1432 а.о. (рисунок 2 В). Вторым охарактеризованным нами маннозным рецептором радужной форели – MRC2. Его

кДНК (GenBank ID: XP_021480466.1) состоит из 4464 п.о., что соответствует 1487 а.о. (рисунок 2 Г).

У всех исследованных последовательностей MRC есть восемь общих важных структурных С-лектин-подобных доменов и один общий трансмембранный домен (рисунок 4). MRC1 обоих видов рыб содержит богатый цистеином RICIN-регион (рисунок 2 А, Б), которого нет у MRC2 (рисунок 2 В, Г). Функция этой области связана с процессом связывания и распознавания углеводов (Ваорасерткул, 2005). Во всех структурах, кроме структуры MRC1 большого желтого горбыля (рисунок 2 А), есть один домен фибронектина второго типа (рисунок 2 Б, В, Г). Этот домен является наиболее консервативным в семействе MRC.

Стоит отметить, что оба маннозных рецептора имеют схожие домены, но играют в клетках разные роли (Isacke, 2002). MRC1 в основном участвует во врожденном иммунном ответе, а MRC2 также участвует в иммунном ответе, но согласно литературным данным (Isacke, 2002) и предположениям нашего исследования, его основная функция может заключаться, в основном, в опосредованной деградации лизосомного коллагена.

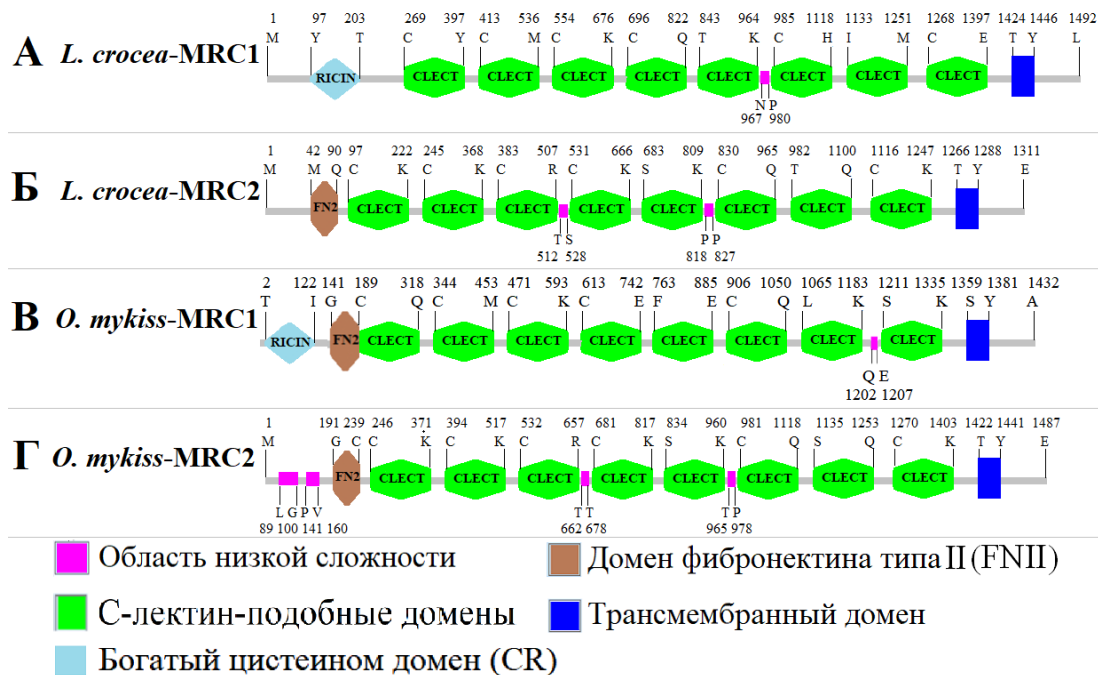


Рисунок 2 - Схема расположения доменов в структуре MRC1 (А, В) и MRC2 (Б, Г) большого желтого горбыля и радужной форели. Цветом обозначены структурные домены MRC1

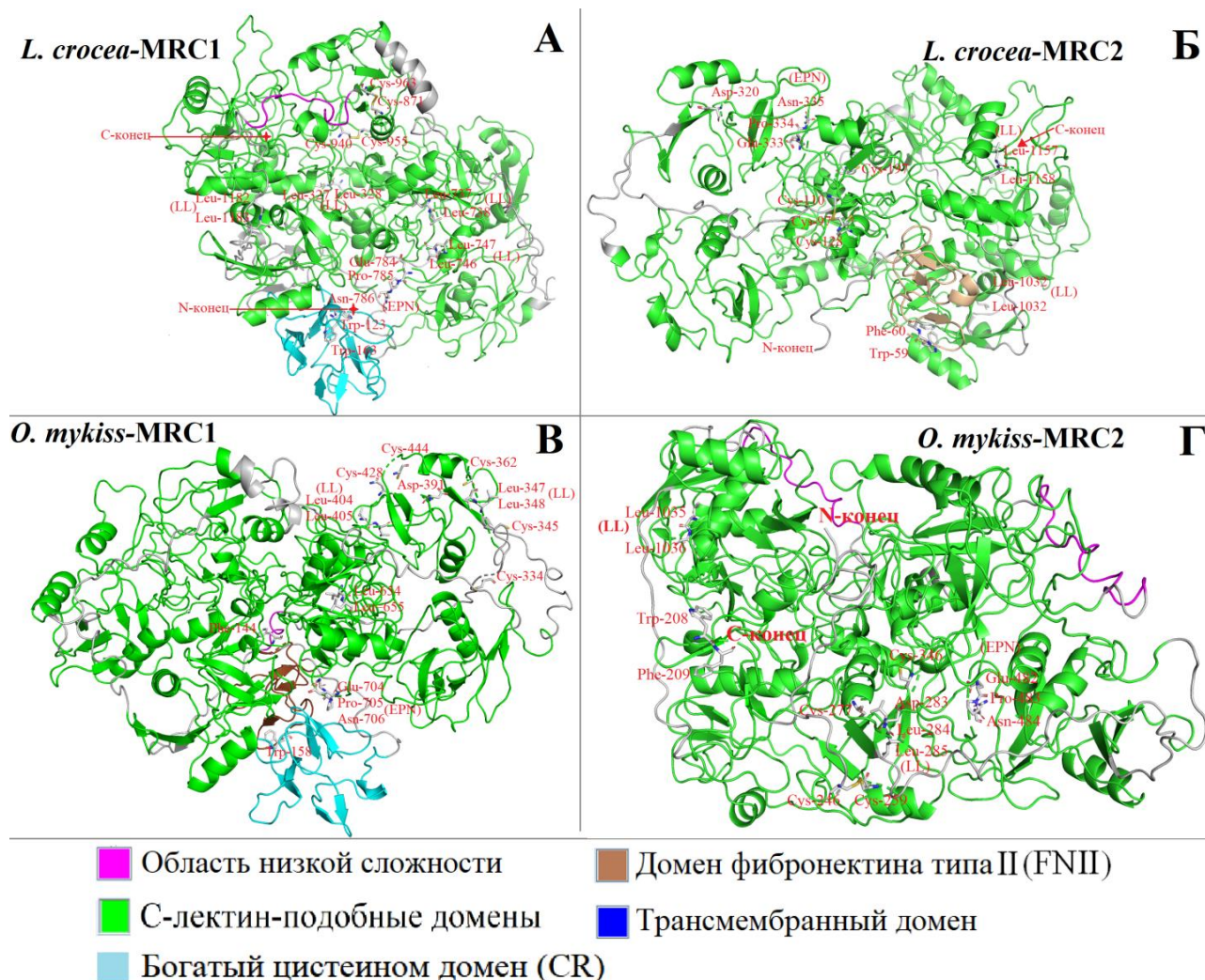


Рисунок 3 - Трехмерные теоретические модели MRC1 (А, В) и MRC2 (Б, Г) большого желтого горбыля и радужной форели, соответственно, с обозначенными критически важными аминокислотами. Цветом обозначены структурные домены MRC1

В последовательностях MRC1 и MRC2 большого желтого горбыля и радужной форели есть похожие функциональные остатки аминокислот (рис. 3).

Ранее было показано, что при интернализации лиганда и миграции ранних эндосом в клетке играет роль именно этот остаток, без которого этот функциональный сайт молекулы инертен (Ваoprasertkul, 2005). Кроме того, у большого желтого горбыля и радужной форели в MRC1 и MRC2 были обнаружены спаренные гидрофобные остатки лейцина (LL) (рисунок 3). Было выдвинуто предположение, что эти два функциональных сайта необходимы для миграции ранних эндосом внутри клетки (Ваoprasertkul, 2005). Присутствие триптофанов (рисунок 3) в сайте связывания коллагена молекул MRC1 и MRC2 большого желтого горбыля и MRC2 радужной форели является определяющим

фактором этой функции (Baoprasertkul, 2005; Napper, 2006). В последовательности MRC2 обоих видов рыб в сайте связывания коллагена содержится фенилаланин, отсутствующий в молекуле MRC1 (рисунок 3 Б, Г). Область CTLD аминокислотных последовательностей MRC1 и MRC2 имеет консервативный домен распознавания углеводов (CRD) (EPN Glu-Pro-Asn) (рисунок 3) (Isacke, 2002; Хуе, 2017), который специфически связывается с маннозой, что указывает на то, что он может обладать активностью связывания углеводов (Kong, 2011).

Таким образом, полученные результаты показывают, что сходство последовательностей MRC2 большого желтого горбыля и радужной форели является относительно высоким, а функциональные аминокислотные остатки относительно схожи, поэтому можно предположить, что биологические функции двух белков также аналогичны.

3.3. Распределение уровней мРНК хемокинов CCL2, CCL3, CCL4 в норме

Экспрессия мРНК CCL2, CCL3 и CCL4 была обнаружена во всех восьми проанализированных тканях и органах: печени, почках, селезенке, мышцах, сердце, мозге, кишечнике и жабрах перед заражением большого желтого горбыля *Vibrio anguillarum*. Это свидетельствует, что большинство хемокинов рыб играет важную роль не только в формировании и поддержании иммунитета, но также могут участвовать в других физиологических процессах в организме рыб.

Результаты наших экспериментальных исследований свидетельствуют, что в печени, почках и селезенке экспрессия мРНК CCL2, CCL3 и CCL4 была значительно выше, чем в других органах (рисунок 4 А, Б, В). Вероятнее всего, это связано с тем, что в печени, почках и селезенке рыб содержится большое количество иммунных клеток, таких как макрофаги и лимфоциты.

Наши данные согласуются с литературными источниками (Cuesta, 2010), утверждающими, что хемокины в основном синтезируются в тканях, связанных с иммунитетом (печень, почки и селезенка).

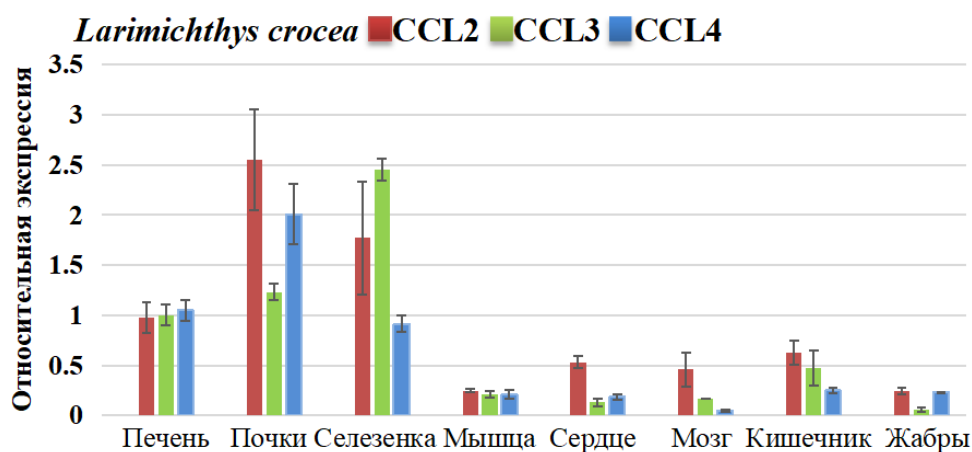


Рисунок 4 - Распределение уровней экспрессии мРНК CCL2 (А), CCL3 (Б) и CCL4 (В) перед заражением *V. anguillarum* в печени, почках, селезенке, мышцах, сердце, мозге, кишечнике и жабрах, полученное методом ПЦР в реальном времени. Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по пяти техническим повторностям; $n = 3$ / группа / период времени

3.4. Анализ уровней мРНК CCL2, CCL3 и CCL4 *L. crocea* в модели вibriоза

Для выяснения распространения воспаления среди разных органов и тканей в динамике на примере иммунных белков хемокинов была построена модель вибриоза у промыслового вида Китая – большого желтого горбыля с помощью патогенной бактерии *V. anguillarum*. В качестве контроля наличия воспаления был введен препарат Poly I:C, вызывающий неспецифическое воспаление.

После заражения патогеном были проанализированы уровни экспрессии CCL2, CCL3 и CCL4 в динамике от начала эксперимента до 72 часов (рисунок 5).

В результате проведения ПЦР в реальном времени исследованных органов (печень, почки, селезенка) в различных временных точках, было обнаружено, что острая фаза воспаления была уже спустя 6 часов после начала эксперимента: экспрессия всех трех хемокинов была существенно повышена по сравнению с контролем. Исключением оказался хемокин CCL4: накопление продуктов экспрессии его гена в селезенке достигло своего максимума только спустя 12-24 часа, что, видимо, связано с особенностями экспрессии этого хемокина при системном воспалении. Спустя 36 часов и до конца эксперимента

наблюдалось общее снижение уровней мРНК хемокинов и стабилизация степени их экспрессии практически на одном уровне.

После экспериментального заражения бактерией *V. anguillarum* в органах большого желтого горбыля было обнаружено, что экспрессия мРНК генов CCL2, CCL3 и CCL4 тесно связана с инфекционным процессом, что позволяет утверждать, что эти хемокины участвуют в иммунной реакции против бактериальной инфекции, что согласуется с общемировой литературой. Так, (Dong, 2016) было показано, что иммунологические эффекты хемокинов у большого желтого горбыля слабее, чем у других рыб, что может быть причиной повышенной чувствительности горбыля к различным инфекциям.

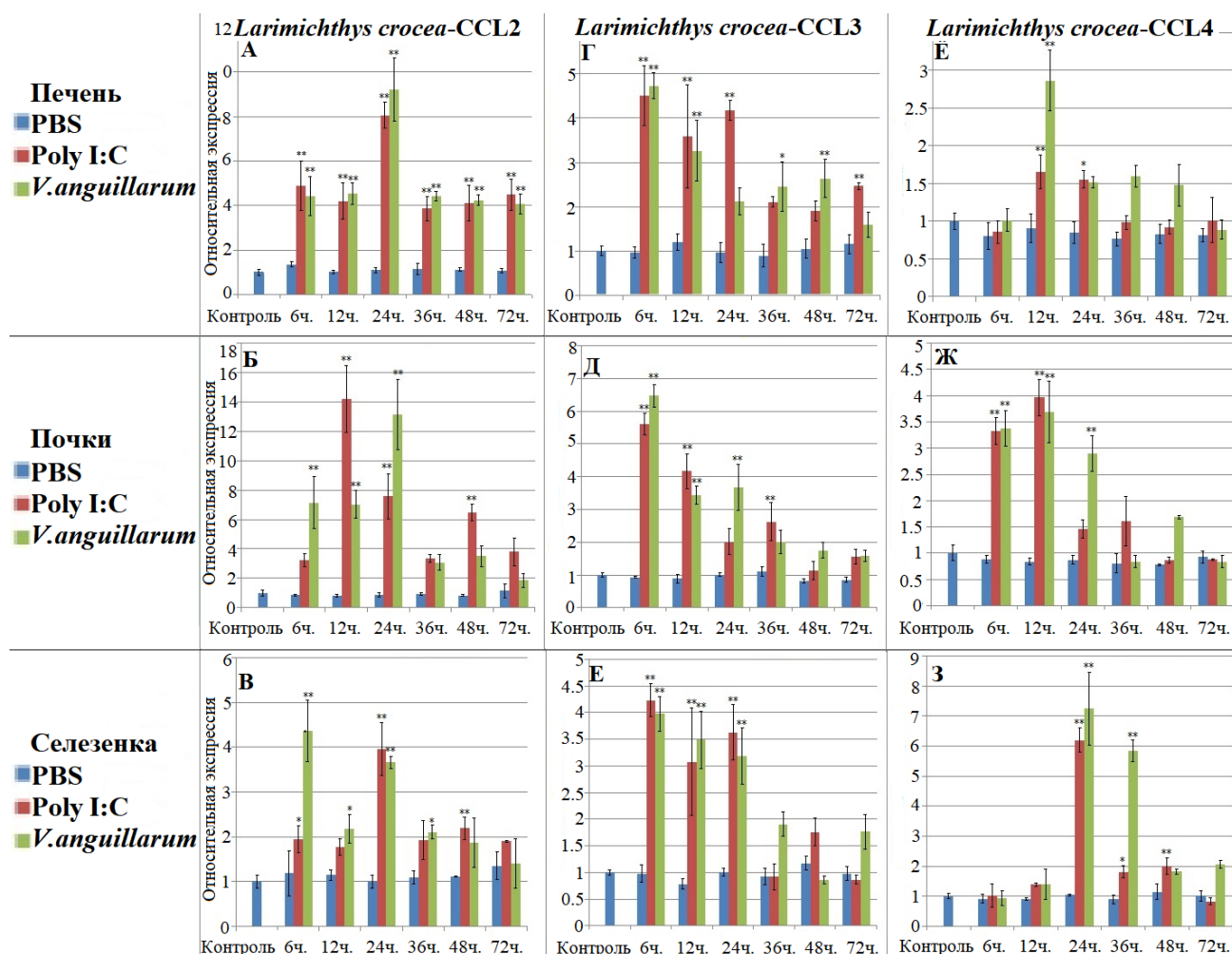


Рисунок 5 - Результаты РТ-ПЦР экспрессии мРНК в динамике хемокинов *L. crocea* в печени, почках и селезенке после введения PBS (отрицательный контроль), Poly I:C (положительный контроль) и *V. anguillarum*. А, Б, В – CCL2; Г, Д, Е - CCL3; Ё, Ж, З - CCL4. Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по 5 повторностям; звездочки обозначают статистически значимые отличия от контроля: “*” при $p < 0,05$. ** при $p < 0,01$; $n = 3$ / группа / период времени

3.5. Распределение уровней мРНК маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 *L. crocea* в норме

Предварительная оценка уровней экспрессии генов маннозных рецепторов была проведена для понимания общих уровней их экспрессии в норме в печени, почках и селезенке большого желтого горбыля.

Наивысший уровень экспрессии мРНК MRC1 и MRC2 был обнаружен в трех из восьми проанализированных органов: печени, почках и селезенке перед заражением *V. anguillarum* (рисунок 6, А, Б).

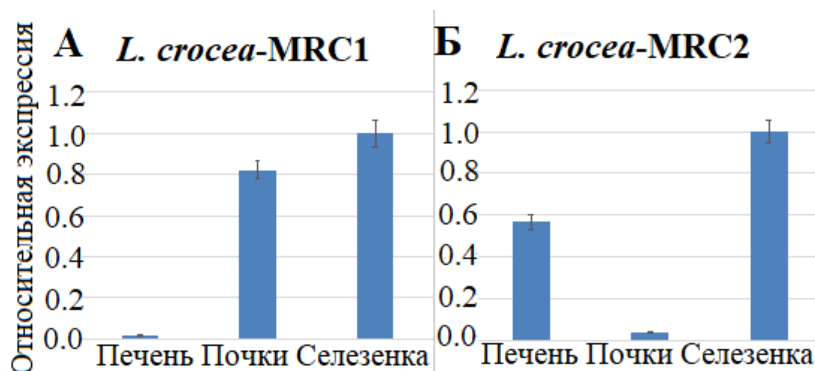


Рисунок 6 - Результаты RT-PCR экспрессии мРНК MRC1 (А) и MRC2 (Б) *L. Crocea* перед заражением *V. anguillarum* в печени, почках, селезенке у большого желтого горбыля. Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по 5 повторностям; n = 3 / группа / период времени

3.6 Анализ уровней мРНК MRC1 и MRC2 *L. Crocea* в модели вибриоза

После заражения патогеном были проанализированы уровни экспрессии MRC1 и MRC2 в динамике от начала эксперимента до 72 часов (рисунок 7). В результате проведения ПЦР в реальном времени исследованных органов (печень, почки, селезёнка) для мРНК MRC1 в различных временных точках, было обнаружено, что острая фаза воспаления наступала спустя 24-36 часов после начала эксперимента: экспрессия обоих маннозных рецепторов была существенно повышена по сравнению с контролем, в 24-36 часов относительная экспрессии достигала максимальных значений (рисунок 7 А, Б, В). Но уровень экспрессии мРНК MRC2 разнится с мРНК MRC1: накопление продуктов экспрессии MRC2 происходит только спустя 24-36 часов после заражения (рисунок 7 Г, Д, Е), а MRC1 экспрессировался уже спустя 6 часов во

всех исследованных органах (рисунок 7 А, Б, В). Очевидно, это связано с особенностями экспрессии этого рецептора при системном воспалении. Во временном промежутке между 36 и 48 часами и до конца эксперимента наблюдалось общее снижение уровней мРНК маннозных рецепторов (рисунок 7). Что касается введённого неспецифического агента Poly I:C, для мРНК MRC1 через 12 часов от начала эксперимента в трех органах относительная экспрессия достигала максимальных значений, а для мРНК MRC2 острая фаза воспаления наступала уже спустя в 6 часов в трех органах, при этом экспрессия обоих маннозных рецепторов была существенно повышена по сравнению с контролем (рисунок 7 Г, Д, Е).

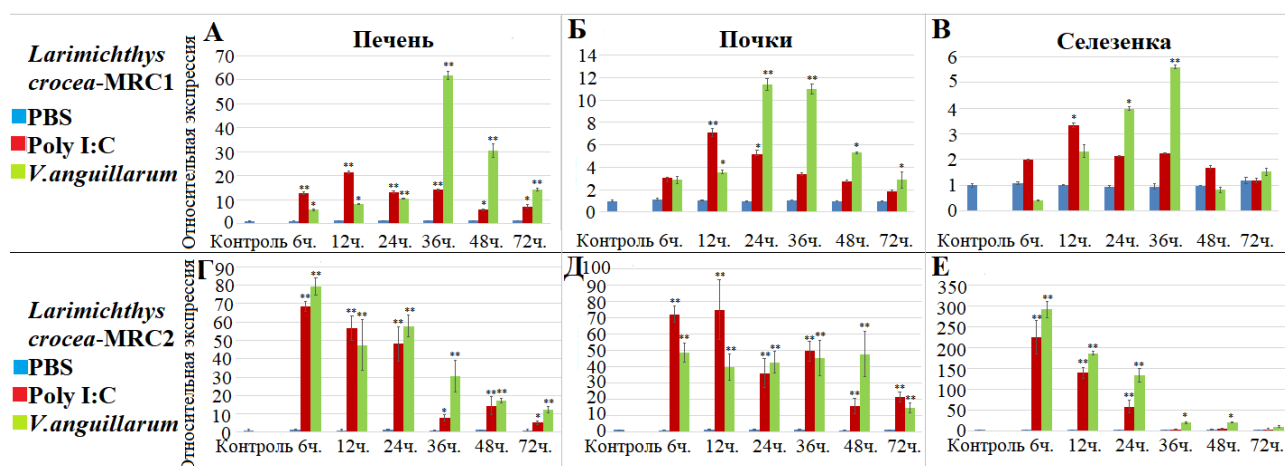


Рисунок 7 - Экспрессия мРНК MRC1 (А, Б, В) и MRC2 (Г, Д, Е) у большого желтого горбыля в печени, почках и селезенке после заражения *V. anguillarum*, Poly I: C (положительный контроль) и PBS (отрицательный контроль).

Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по 5 повторностям; звездочки обозначают статистически значимые отличия от контроля: “*” при $p < 0,05$. ** при $p < 0,01$; $n = 3$ / группа / период времени

Таким образом, после искусственного заражения большого желтого горбыля бактерией *V. anguillarum* мы обнаружили, что экспрессия мРНК генов MRC1 и MRC2 тесно связана с процессом заражения патогеном. Данный факт позволяет утверждать, что маннозные рецепторы участвуют в иммунитете рыб против бактериальной инфекции, что согласуется с литературными данными (Wang, 2006; Balashov, 1999).

По результатам исследования можно сделать вывод, что мРНК MRC1 и MRC2 большого желтого горбыля, в основном, экспрессируются в печени,

почках и селезенке, а уровни их экспрессии различаются как в разных органах, так и в пределах одного органа. Уровни экспрессии в печени, почках и селезенке в органах большого желтого горбыля после заражения *V. anguillarum* были значительно выше по сравнению с контролем, что указывает на то, что гены маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 оказывают регулирующее влияние на протекание вибриоза у большого желтого горбыля. Данный результат может иметь значение для понимания механизма противoinфекционного иммунного ответа рыб и для контроля болезни у этого вида.

Кроме того, анализ экспрессии мРНК MRC1 и MRC2 в печени, почках и селезенке показал, что кривая экспрессии MRC1 отличается от кривой экспрессии MRC2. Для мРНК MRC1 относительная экспрессия в печени, почках и селезенке сначала медленно увеличивалась в течение 24 часа, достигая максимального значения через 48 часов, а затем медленно снижалась. Но для мРНК MRC2 экспрессия в печени, почках и селезенке уже через 6 часов достигала максимума, а затем постепенно снижалась до конечной точки эксперимента. Это также указывает на то, что основные функции MRC1 и MRC2 могут быть разными, что согласуется с литературными данными (Madsen, 2013; Rossi, Zlotnik, 2000).

3.7. Распределение уровней мРНК маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 *O. mykiss* в норме

мРНК MRC рыб широко экспрессируется во многих органах, особенно в почках и селезенке, и играет важную роль в бактериальном иммунном ответе (Zdanovich, 2011). Предварительная оценка уровней экспрессии генов маннозных рецепторов была выполнена для понимания общих уровней их экспрессии в норме в печени, почках и селезенке радужной форели. Экспрессия мРНК MRC1 и MRC2 была обнаружена во всех трех проанализированных органах перед заражением *Aeromonas salmonicida* ssp. Экспрессия мРНК MRC1 показала самый высокий уровень в селезенке, а экспрессия мРНК MRC2 - в печени (рисунок 8).

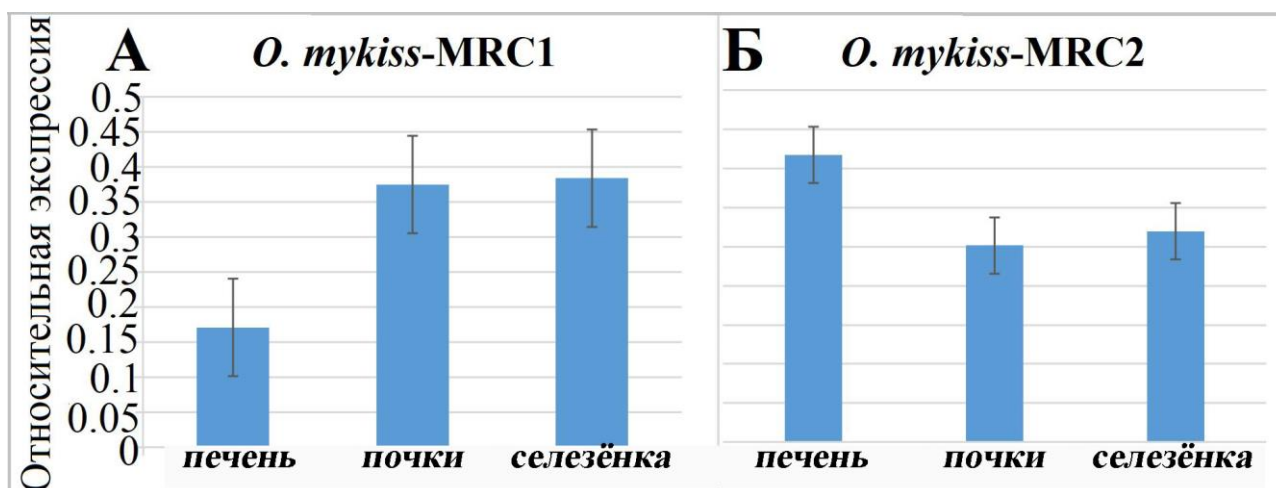


Рисунок 8 - Экспрессия мРНК MRC1 (А) и MRC2 (Б) *O. mykiss* в печени, почках и селезенке у здоровых особей радужной форели. Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по 5 повторностям; $n = 3$ / группа / период времени

3.8. Анализ уровней мРНК MRC1 и MRC2 *O. mykiss* в модели аэромоноза

Во время вскрытия рыб в конечных точках эксперимента была проведена морфологическая оценка их состояния в сравнении с контролем. Патолого-анатомический анализ радужной форели, выполненный после заражения *A. salmonicida* ssp., не выявил признаков внешних изменений в организме рыб, однако, объем печени у зараженных особей был больше, чем у здоровых.

После заражения патогеном были проанализированы уровни экспрессии MRC1 и MRC2 у радужной форели в динамике от начала эксперимента до 72 часов (рисунок 9). Результаты ПЦР в реальном времени мРНК MRC1 радужной форели в различных временных точках показали, что экспрессия MRC1 в почках и селезенке (рисунок 9 Б, В), а MRC2 в печени и селезенке (рисунок 9 Г, Е) была существенно повышена по сравнению с контролем и в 24-36 часов достигала максимальных значений (рисунок 9 Б, В, Г, Е).

Спустя 24 часа от начала заражения наблюдалось временное повышение экспрессии MRC1 в почках (рисунок 9 Б), в то время как в печени его экспрессия снизилась (рисунок 9 А). После этой переломной точки наблюдалась вторая волна экспрессии MRC1 в печени в точках 36 и 48 часов

(рисунок 9 А). Этот феномен требует дополнительных экспериментов и подтверждений перед достоверными выводами.

Результаты изучения уровней экспрессии маннозных рецепторов у радужной форели и большого желтого горбыля свидетельствуют, что уровни их экспрессии различаются до и после заражения рыб инфекционным агентом. Кроме того, накопление мРНК маннозных рецепторов при заражении осуществляется в одних и тех же органах.

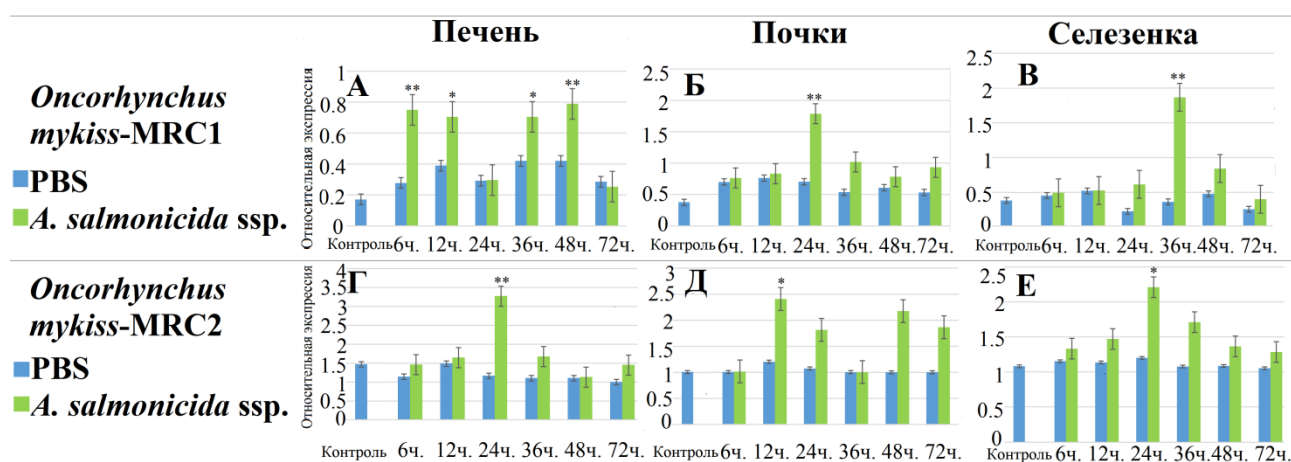


Рисунок 9 - Экспрессия мРНК MRC1 (А, Б, В) и MRC2 (Г, Д, Е) у радужной форели в печени, почках и селезенке после заражения *A. salmonicida* ssp. (PBS – отрицательный контроль). Стандартное отклонение (\pm SD) представлено по 5 повторностям; звездочки обозначают статистически значимые отличия от контроля: “*” при $p < 0,05$, “**” при $p < 0,01$; $n = 3$ / группа / период времени

Важно, что в печени после заражения *V. anguillarum* у большого желтого горбыля относительные уровни экспрессии гена MRC1 в 60 раз выше, а гена MRC2 в 70 раз выше, чем у рыб из группы отрицательного контроля (рисунок 9 А, Г), а в селезенке относительные уровни экспрессии мРНК MRC2 после заражения в 250 раз выше (рисунок 9 В), чем в группе отрицательного контроля. С другой стороны, в печени радужной форели после заражения *A. salmonicida* ssp. относительная экспрессия мРНК MRC1 (рисунок 9 А) и MRC2 (рисунок 9 Г) была всего в 4 и 2 раза выше, чем у контрольной группы рыб. Это показывает, что, хотя мРНК MRC1 и MRC2 широко экспрессируется в тканях большого желтого горбыля и радужной форели, ее специфическая экспрессия отличается, что может быть связано с температурой воды, размером и иммунным статусом

рыб, типом инфицирующих бактерий.

Таким образом, на основе проведенных опытов были созданы действующие модели бактериальных инфекций в экспериментальных условиях; установлены фактические уровни экспрессии белков иммунной системы в норме и при патологии в динамике.

Проанализированный иммунный ответ генов хемокинов у большого желтого горбыля *L. crocea* и маннозных рецепторов у радужной форели *O. mykiss* в моделях вибриоза и аэромороза дополнит имеющиеся знания о развитии заболеваний промысловых и культивируемых видов рыб в динамике и поможет осуществить дальнейшие исследования в области их иммунитета и механизмов общей иммунной регуляции.

ВЫВОДЫ

1. Впервые построены *in silico* теоретические пространственные структуры белков-хемокинов CCL2, CCL3, CCL4, а также маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 рыб, выращиваемых в условиях аквакультуры Китая (большой желтый горбыль *L. crocea*) и России (радужная форель *O. mykiss*), на основании которых установлены структурно-функциональные взаимосвязи этих белков иммунного ответа.
2. Установлена высокая степень идентичности первичных и третичных структур маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 у большого желтого горбыля и радужной форели, достигающая 84%, что подтверждает высокую схожесть этих белков вне зависимости от вида и среды обитания и, как следствие, потенциальную универсальность иммунного ответа у тепловодных и холодноводных видов.
3. Созданы *in vivo* модели типичных заболеваний культивируемых видов рыб – вибриоз (на примере большого желтого горбыля) и аэромороз (на примере радужной форели), в которых выявлены многократные увеличения экспрессии генов белков иммунного ответа - CCL2, CCL3, CCL4, MRC1 и MRC2, что подтверждает их высокую эффективность для оценки динамики

воспалительного процесса и апробации биологически активных веществ в условиях аквакультуры.

4. Установлено, что хемокины CCL2, CCL3 и CCL4 в норме синтезируются во всех органах рыб, а наибольшая их экспрессия наблюдается в печени, почках и селезенке. В модели вибриоза относительные уровни экспрессии генов этих белков в печени, почках и селезенке схожи: гены CCL2 и CCL3 реагируют на инфекцию значительно быстрее, проявляя максимум спустя 6 часов, а экспрессия CCL4 достигает своего максимума лишь спустя 12 часов после инфицирования.

5. Исследована динамика экспрессии генов маннозных рецепторов MRC1 и MRC2 в различных органах рыб в моделях вибриоза и аэромоноза. Установлено, что при схожих локализациях их экспрессии (печень, почки, селезенка), у тепловодного большого желтого горбыля *L. crocea* иммунный ответ на заражение в созданных моделях наступает быстрее и проявляется интенсивнее, чем у холодноводной радужной форели *O. mykiss*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях Science Citation Index и списка ВАК

1. **Dong X.**, Li J., He J., Liu W., Jiang L., Ye Y., Wu C. Anti-infective mannose receptor immune mechanism in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) // *Fish and shellfish immunology*. 2016, 54:257-65.
2. Liu W., Jiang L., **Dong X.**, Liu X., Kang L., Wu C. Molecular characterization and expression analysis of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) complement component C6 after bacteria challenge // *Aquaculture*. 2016, 458:107–112.
3. He J., Liu H., Yang J., **Dong X.**, Wu C. Abundant members of Scavenger receptors family and their identification, characterization and expression against *Vibrio alginolyticus* infection in juvenile *Larimichthys crocea*. *Fish and shellfish immunology*. 2016, 50:297-309.
4. Li J., Zu T., **Dong X.**, Yang X., Liu W., Wu C. Characterization of Dual and Homeostatic Chemokine Expression and Response to Bacterial Infection in Large

Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) // *Pakistan Journal of Zoology*. 2018, 50(4):1199-1600.

5. **Dong X.**, Shilin M.B., Apalikova O.V., Lukina J.N., Golotin V.A., Li J., Zhang J. The Anti-Infective Immune Mechanism of the CCL2 and CCL3 Chemokines in the Large Yellow Croaker (*Larimichthys crocea*) // *Journal of Applied Ichthyology*. 2021 <https://doi.org/10.1111/jai.14214>.
6. Шилин М. Б., Жигульский В. А., Бобылев Н.Г., Ахмад Алаа, Леднова Ю.А., **Дун С.** Развитие комплекса компенсационных мероприятий по снижению негативного воздействия строительства аванпорта Бронка на Южном берегу Невской губы // *Естественные и технические науки* (2020) Выпуск № 3: Стр. 178-188.
7. **Xiangli Dong**, Mikhail B. Shilin, Jiji Li, Jianyu He, Zeqin Fu, Yingying Ye, Julia N. Lukina, Olga V. Apalikova, Jianshe Zhang. Prokaryotic expression, purification, and functional characterization of the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) mannose receptors subunits (MRC1 and MRC2). *Pakistan Journal of Zoology* (в печати).

Материалы конференций

1. **Дун С.**, Шилин М.Б., Апаликова О.В., Лукина Ю.Н. Исследование молекулярных механизмов иммунитета для борьбы с инфекциями в аквакультуре / Коллективная монография по материалам ежегодной международной научно-практической конференции «География: развитие науки и образования» // ISBN: 978-5-8064-2885-2, Санкт-Петербург, издательство: Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, (22-25. 04. 2020 г.). - 526 с. (с. 48-52).
2. **Дун С.**, Шилин М.Б., Лукина Ю.Н. Исследование механизмов иммунного ответа для разработки новой технологии защиты рыб от инфекций в условиях аквакультуры / Сборник тезисов Международной научно-практической конференции «Современные проблемы гидрометеорологии и мониторинга окружающей среды на пространстве СНГ», посвященной 90-летию Российского государственного гидрометеорологического университета. //

ISBN: 978-5-86813-508-8, Санкт-Петербург, издательство: Российский государственный гидрометеорологический университет. (22-24. 10. 2020 г.). - 794 с. (с. 497-498).

3. Дун С., Шилин М.Б. Текущее состояние аквакультуры и методы защиты аквакультуры в Китае / Труды IV Всероссийской конференции «Гидрометеорология и Экология: достижения и перспективы развития / MGO» // ISBN 978-5-93808-367-7, Санкт-Петербург, издательство: ХИМИЗДАТ, (16-17. 12. 2020 г.). – 459 с. (с. 131-134).
4. Дун С., Шилин М.Б. Современное состояние и задачи развития аквакультуры в Китае / Материалы Всероссийской научной конференции «Экологическая деятельность и экологическое просвещение: региональный аспект» // ISBN: 978-5-8290-1918-1, Санкт-Петербург, издательство: Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина, (16. 12. 2020). – 268 с. (с. 255-258).
5. Дун С. Обеспечение устойчивого развития аквакультуры путем повышения естественного иммунитета культивируемых рыб / Материалы международной научной конференции «XXV Юбилейные Царскосельские чтения» // ISBN: 978-5-8290-1969-3, Санкт-Петербург, издательство: Ленинградский государственный университет имени А.С. Пушкина, (20-21.04. 2021 г.). - 316 с. (с. 77-82).