

Приложение №6
к отчетным документам, представляемым
исполнителем НИР по гранту для
проведения планового контроля

АННОТИРОВАННЫЙ ОТЧЕТ (*)
о результатах НИР по гранту за 2018-2019 г

Конкурс 2018 года на соискание грантов
для поддержки научно-исследовательской работы
аспирантов и молодых сотрудников ИГУ.

Направление биология

Шифр гранта 091-18-221

1. Наименование НИР по гранту «Исследование иммунной реакции эндемичных байкальских амфипод на микрофлору, выделенную из их гемолимфы»

2. Структурное подразделение (кафедра, лаборатория) биолого-почвенный факультет, кафедра зоологии беспозвоночных и гидробиологии, НИИ биологии «ИГУ», лаборатория «Проблемы адаптации биосистем»

3. Исполнитель НИР Щапова Екатерина Павловна
(Ф.И.О)

4. Координаты исполнителя НИР



5. Ожидаемые результаты в соответствии с заявленным планом работы:

Одной из наиболее значимых групп байкальских гидробионтов является фауна эндемичных байкальских амфипод (Amphipoda, Crustacea). Данная группа представлена более чем 350 видами и подвидами амфипод (99% эндемики), составляющими существенную часть биомассы макробентосных животных озера и играющими важную роль в пищевых сетях Байкала, благодаря чему амфиподы имеют большое значение в экосистеме этого глубочайшего в мире озера. Исследования беспозвоночных в течение последних двух десятилетий показали, что внутренняя среда ракообразных (гемолимфа, межклеточная среда гепатопанкреаса и пр.) в норме не всегда является стерильной и у многих видов может быть населена микроорганизмами даже в отсутствие каких-либо патологических процессов в организме. Проведённый ранее анализ заражённости эндемичных литоральных амфипод Байкала также показал наличие ряда культивируемых штаммов бактерий в их гемолимфе. Однако полностью неисследованным остаётся вопрос взаимодействия микрофлоры гемолимфы с иммунной системой байкальских амфипод. Таким образом, целью данной работы является оценка реакции иммунной системы эндемичных байкальских амфипод на различные концентрации штаммов бактерий, выделенных из их гемолимфы и

культивированных в лабораторных условиях. В частности, иммунная реакция будет оценена по активности фермента фенолоксидазы после введения микроорганизмов в амфипод, а также с помощью метода первичных клеточных культур гемоцитов амфипод. На основании полученных результатов будет получена информация об относительной скорости распознавания различных групп бактерий иммунной системы амфипод.

6. Основные полученные научные результаты:

Исследование иммунитета беспозвоночных сосредоточено на исследовании защитных механизмов и активации биохимических путей во время инфекции, а также клеточных факторах, участвующих в разрушении патогенов, регуляции и восстановлении при повреждениях.

Эффекторные механизмы иммунного ответа беспозвоночных включают в себя коагуляционный каскад, который позволяет избежать потери гемолимфы и стимулирует окислительные метаболиты и продуцирование меланина путем активации системы профенолоксидазы. Активация пропенолоксидазы стимулирует важные процессы в иммунном ответе, такие как фагоцитоз и инкапсуляция. Активация таких процессов, по-видимому, опосредуется путем специфического распознавания гликозилированных патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs) белками ракообразных.

Микроорганизмы имеют высококонсервативные и широко распространенные молекулы в клеточных стенках, такие как липополисахариды (LPS) или пептидогликаны (PGN) и β -1,3-глюканов в грибковых клетках, которые не встречаются в многоклеточных организмах. Механизм активации иммунных белков происходит за счет распознавания рецепторами эпитопа или антигенной детерминантой таких как липополисахариды, пептидогликаны и β -1,3-глюканы.

Важной характеристикой развития иммунитета ракообразных является способность различать свои и аномальные частицы. Белки с функцией распознавания, которые являются предшественниками антител, называются лектинами. Они обладают свойствами распознавать поверхности клеток и способны индуцировать агглютинацию, фагоцитоз действуя как опсоины.

В качестве проверки развития иммунного ответа у амфипод на собственные группы бактерий была проанализирована микробиота гемолимфы 10 амфипод *Eulimnogammarus verrucosus*. В ходе исследования было выделено 311 штаммов (табл. 1), из которых 226 штаммов из гемолимфы (рис.1) и 85 штаммов (рис.2) с поверхности хитина амфипод.



Рис. 1. Идентификация штаммов выделенных из гемолимфы амфипод.



Рис. 2 Идентификация штаммов, выделенных из смыва хитинового покрова в области сбора гемолимфы.

Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью MALDI Biotyper 3.0, посредством прямого нанесения. Результаты идентификации микроорганизмов показали, что большая часть выделенных штаммов относятся к роду *Pseudomonas*. Для проверки иммунного ответа на выделенные штаммы из гемолимфы амфипод был выбран штамм *Pseudomonas frederiksbergensis*, который оказался наиболее часто встречающимся из рода *Pseudomonas*.

В качестве дополнительного систематического исследования чувствительности фермента иммунной системы - фенолоксидазы и полученной первичной культуры гемоцитов амфипод (рис. 3) к микроорганизмам использовали суспензию клеток *Escherichia coli*, в качестве положительного контроля, в концентрации равной *P. frederiksbergensis*.

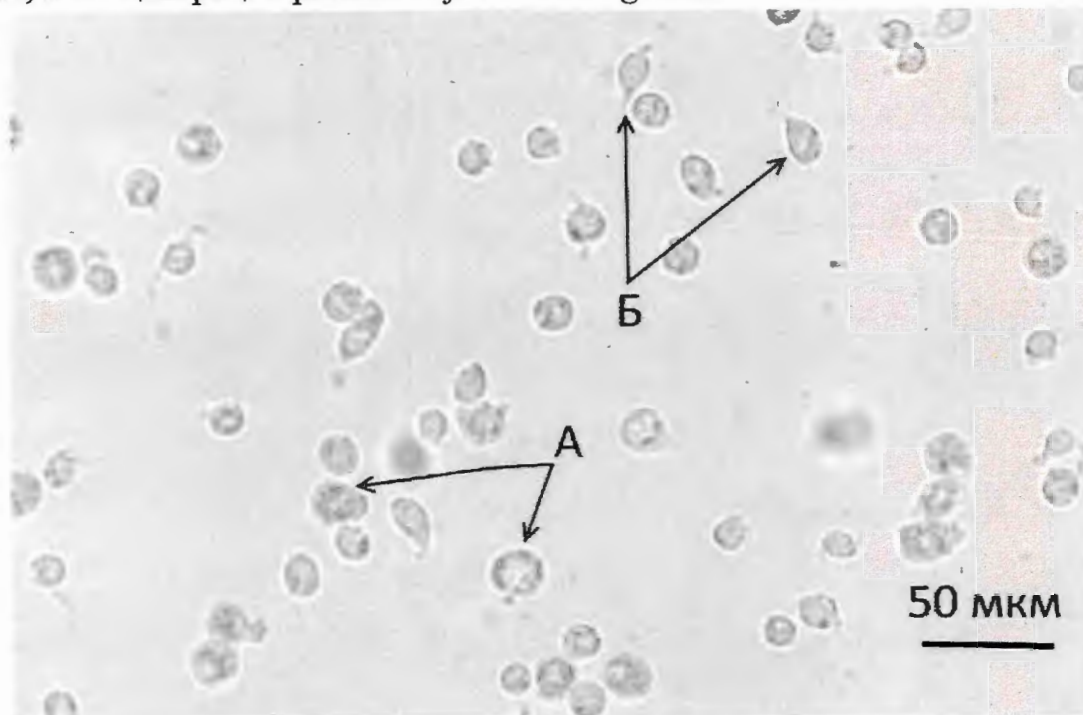


Рис. 3. Гемоциты *E. verrucosus*. А – клетки округлой формы; Б – клетки веретенообразной формы.

На рис. 4 представлены данные влияния инъекции микроорганизмов *E. coli* и *P. frederiksbergensis* на активность фермента фенолоксидазы. По результатам исследования было показано, что статистически значимых изменений в активности фенолоксидазы не наблюдали относительно контрольной группы.

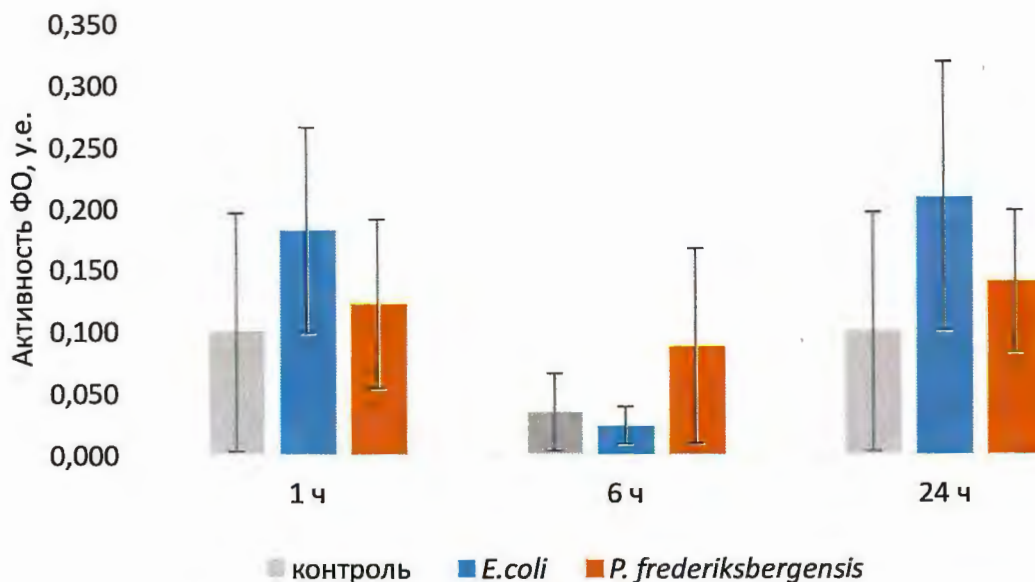


Рис. 4 Влияние инъекции штаммов *E. coli* и *P. frederiksbergensis* на активность фенолоксидазы у амфипод *E. verrucosus*.

Данные по агрегационной активности гемоцитов в присутствии разных штаммов представлены на рисунке 5. Было показано, что статистически значимое повышение агрегации по сравнению с контрольной группой наблюдается в ответ на оба типа исследуемых микроорганизмов уже через 1 час после начала инкубации (все $p < 0,01$). Агрегация гемоцитов в присутствии *E. coli* и *P. frederiksbergensis* наблюдается в диапазоне от 30 до 80 % гемоцитов в агрегате, в то время как в контроле – от 5 до 30 %.

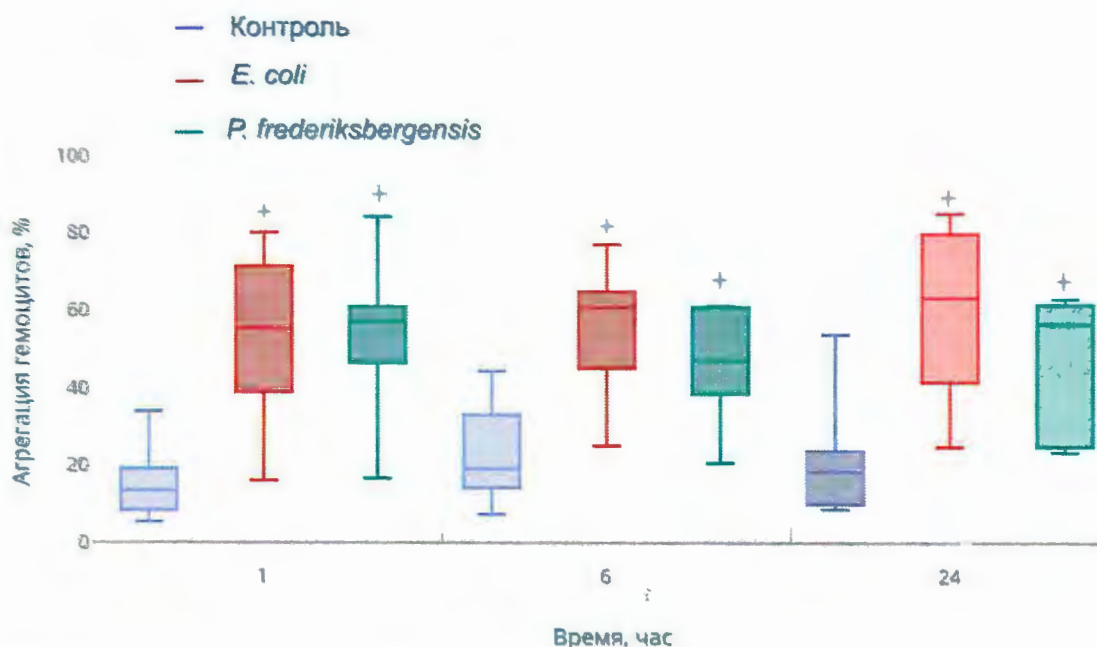


Рис. 5 Агрегация гемоцитов при внесении в среду штаммов *E. coli* и *P. frederiksbergensis*.
+ - статистически значимое различие $p < 0,01$

Таким образом, в данной работе была оценена иммунная реакция эндемичных байкальских видов амфипод на разнообразные штаммы микроорганизмов. Несмотря на использование штамма *P. frederiksbergensis*, выделенного из собственной гемолимфы *E. verrucosus*, наблюдали выраженный иммунный ответ схожий с иммунным ответом на *E. coli*, штаммом, не встречающимся в организме амфипод. Проведённый анализ показывает, что первичная культура гемоцитов, выделенная из амфипод является наиболее чувствительной для оценки иммуногенности на инородные объекты. Это открывает новые возможности для изучения особенностей иммунного ответа амфипод и проведения исследования симбиотических отношений амфипод с эндосимбионтами.

Таблица 1

	Гемолимфа, шт.	Смыв, шт.
<i>Pseudomonas sp.</i>	179	42
<i>Microbacterium sp.</i>	-	2
<i>Rhodococcus sp.</i>	15	13
<i>Kocuria rhizopila</i>	1	-
<i>Sphingobacterium sp.</i>	-	1
<i>Pseudoclavibacter sp.</i>	-	1
не определён	26	17
на определении	5	9
общее количество	226	85

7. Предполагаемое использование результатов, в том числе в учебном процессе

Полученные результаты являются не только фундаментальными исследованиями, но и имеют практическое значение. В данной работе был разработан эффективный инструмент, с помощью которого может быть оценена иммунная реакция эндемичных байкальских видов амфипод на разнообразные чужеродные объекты. Выделенные штаммы бактерий, которые могут жить в гемолимфе ракообразных в высоких концентрациях без инициирования иммунного ответа, являются ценным биотехнологическим ресурсом.

8. Перечень публикаций^(**) по результатам работы (статьи, доклады) с приложением оттисков или рукописей, направленных в печать

1. Имплантируемые полиэлектролитные микросенсоры как инструмент для прижизненной динамической диагностики физиологического состояния

- ракообразных и оценка их влияния на организм/Щапова Е.П., Назарова А.А., Гурков А.Н., Дмитриев И.А.// Международный научный форум «Ломоносов-2019», Москва Россия, 8-12 апреля 2019. - С. 1-2;
2. Оценка влияния имплантируемых полиэлектролитных микросенсоров на организм *Eulimnogammarus verrucosus*/ Щапова Е.П., Назарова А.А., Гурков А.Н., Дмитриев И.А., Ржечицкий Я.А.// II Международная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Социально-экологические проблемы байкальского региона и сопредельных территорий”, 22 апреля, Иркутск – С. 1-2;
 3. Изучение иммуногенности полиэлектролитных микрокапсул в первичной культуре гемоцитов амфипод/ Назарова А. А., Гурков А. Н., Щапова Е. П., Тимофеев М. А. // Биология – наука XXI века: 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. 15 - 19 апреля 2019 г., Пущино. Сборник тезисов, 2019. – С. 56-57.

Исполнитель НИР по гранту Щапова Е.П. (Ф.И.О.)
(подпись)

* Аннотированные отчеты будут размещены на сайте ИГУ

** Учитываются только публикации со ссылкой на финансовую поддержку ИГУ

Приложение №6
к отчетным документам, представляемым
исполнителем НИР по гранту для
проведения планового контроля

АННОТИРОВАННЫЙ ОТЧЕТ (*)
о результатах НИР по гранту за 2018-2019 г

Конкурс 2018 года на соискание грантов
для поддержки научно-исследовательской работы
аспирантов и молодых сотрудников ИГУ.

Направление биология

Шифр гранта 091-18-221

1. Наименование НИР по гранту «Исследование иммунной реакции эндемичных байкальских амфипод на микрофлору, выделенную из их гемолимфы»

2. Структурное подразделение (кафедра, лаборатория) биолого-почвенный факультет, кафедра зоологии беспозвоночных и гидробиологии, НИИ биологии «ИГУ», лаборатория «Проблемы адаптации биосистем»

3. Исполнитель НИР Щапова Екатерина Павловна
(Ф.И.О)

4. Координаты исполнителя НИР +79149533627, shchapova.katerina@gmail.com
(телефон, факс, E-mail)

5. Ожидаемые результаты в соответствии с заявленным планом работы:

Одной из наиболее значимых групп байкальских гидробионтов является фауна эндемичных байкальских амфипод (Amphipoda, Crustacea). Данная группа представлена более чем 350 видами и подвидами амфипод (99% эндемики), составляющими существенную часть биомассы макробентосных животных озера и играющими важную роль в пищевых сетях Байкала, благодаря чему амфиподы имеют большое значение в экосистеме этого глубочайшего в мире озера. Исследования беспозвоночных в течение последних двух десятилетий показали, что внутренняя среда ракообразных (гемолимфа, межклеточная среда гепатопанкреаса и пр.) в норме не всегда является стерильной и у многих видов может быть населена микроорганизмами даже в отсутствие каких-либо патологических процессов в организме. Проведённый ранее анализ заражённости эндемичных литоральных амфипод Байкала также показал наличие ряда культивируемых штаммов бактерий в их гемолимфе. Однако полностью неисследованным остаётся вопрос взаимодействия микрофлоры гемолимфы с иммунной системой байкальских амфипод. Таким образом, целью данной работы является оценка реакции иммунной системы эндемичных байкальских амфипод на различные концентрации штаммов бактерий, выделенных из их гемолимфы и

культивированных в лабораторных условиях. В частности, иммунная реакция будет оценена по активности фермента фенолоксидазы после введения микроорганизмов в амфипод, а также с помощью метода первичных клеточных культур гемоцитов амфипод. На основании полученных результатов будет получена информация об относительной скорости распознавания различных групп бактерий иммунной системы амфипод.

6. Основные полученные научные результаты:

Исследование иммунитета беспозвоночных сосредоточено на исследовании защитных механизмов и активации биохимических путей во время инфекции, а также клеточных факторах, участвующих в разрушении патогенов, регуляции и восстановлении при повреждениях.

Эффекторные механизмы иммунного ответа беспозвоночных включают в себя коагуляционный каскад, который позволяет избежать потери гемолимфы и стимулирует окислительные метаболиты и продуцирование меланина путем активации системы профенолоксидазы. Активация пропенолоксидазы стимулирует важные процессы в иммунном ответе, такие как фагоцитоз и инкапсуляция. Активация таких процессов, по-видимому, опосредуется путем специфического распознавания гликозилированных патоген-ассоциированных молекулярных структур (PAMPs) белками ракообразных.

Микроорганизмы имеют высококонсервативные и широко распространенные молекулы в клеточных стенках, такие как липополисахариды (LPS) или пептидогликаны (PGN) и β -1,3-глюканов в грибковых клетках, которые не встречаются в многоклеточных организмах. Механизм активации иммунных белков происходит за счет распознавания рецепторами эпитопа или антигенной детерминантой таких как липополисахариды, пептидогликаны и β -1,3-глюканы.

Важной характеристикой развития иммунитета ракообразных является способность различать свои и аномальные частицы. Белки с функцией распознавания, которые являются предшественниками антител, называются лектинами. Они обладают свойствами распознавать поверхности клеток и способны индуцировать агглютинацию, фагоцитоз действуя как опсонины.

В качестве проверки развития иммунного ответа у амфипод на собственные группы бактерий была проанализирована микробиота гемолимфы 10 амфипод *Eulimnogammarus verrucosus*. В ходе исследования было выделено 311 штаммов (табл. 1), из которых 226 штаммов из гемолимфы (рис.1) и 85 штаммов (рис.2) с поверхности хитина амфипод.



Рис. 1. Идентификация штаммов выделенных из гемолимфы амфипод.



Рис. 2 Идентификация штаммов, выделенных из смыва хитинового покрова в области сбора гемолимфы.

Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью MALDI Biotyper 3.0, посредством прямого нанесения. Результаты идентификации микроорганизмов показали, что большая часть выделенных штаммов относится к роду *Pseudomonas*. Для проверки иммунного ответа на выделенные штаммы из гемолимфы амфипод был выбран штамм *Pseudomonas frederiksbergensis*, который оказался наиболее часто встречающимся из рода *Pseudomonas*.

В качестве дополнительного систематического исследования чувствительности фермента иммунной системы - фенолоксидазы и полученной первичной культуры гемоцитов амфипод (рис. 3) к микроорганизмам использовали суспензию клеток *Escherichia coli*, в качестве положительного контроля, в концентрации равной *P. frederiksbergensis*.

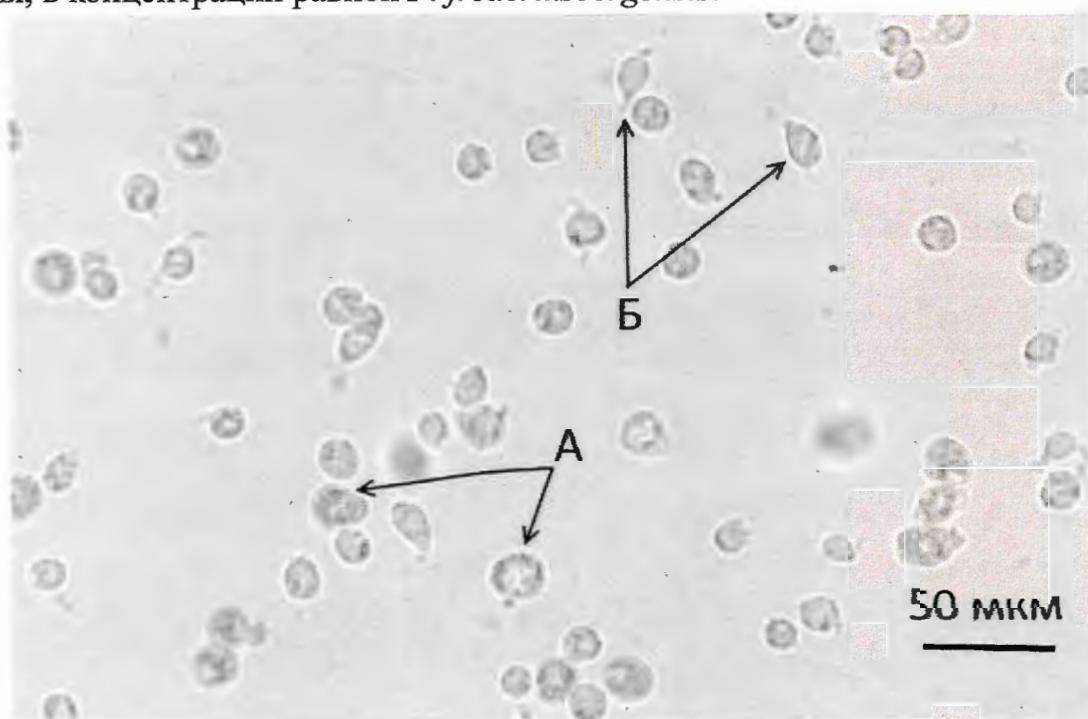


Рис. 3. Гемоциты *E. verrucosus*. А – клетки округлой формы; Б – клетки веретенообразной формы.

На рис. 4 представлены данные влияния инъекции микроорганизмов *E. coli* и *P. frederiksbergensis* на активность фермента фенолоксидазы. По результатам исследования было показано, что статистически значимых изменений в активности фенолоксидазы не наблюдали относительно контрольной группы.

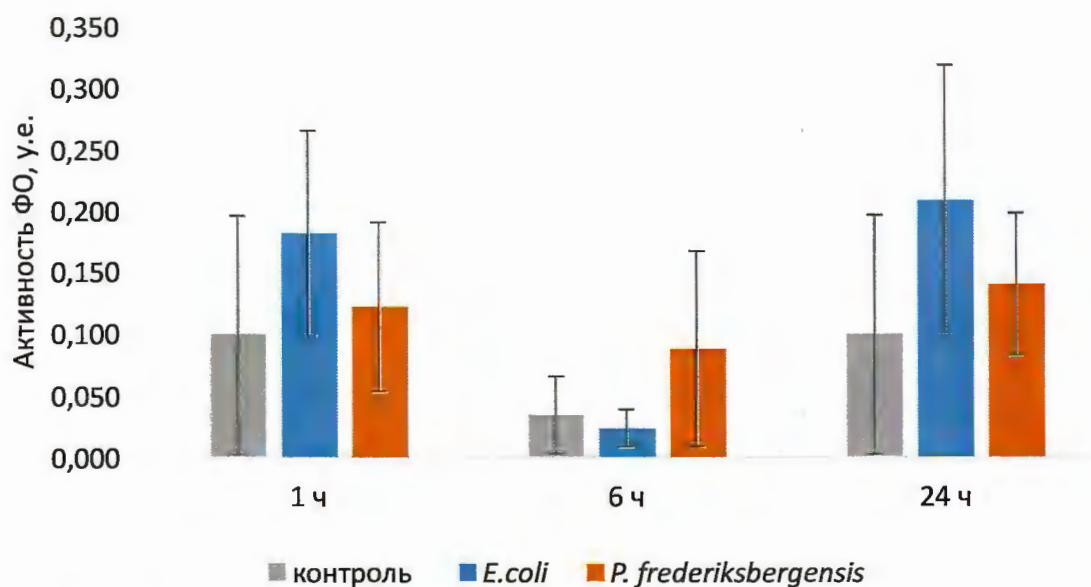


Рис. 4 Влияние инъекции штаммов *E. coli* и *P. frederiksbergensis* на активность фенолоксидазы у амфипод *E. verrucosus*.

Данные по агрегационной активности гемоцитов в присутствии разных штаммов представлены на рисунке 5. Было показано, что статистически значимое повышение агрегации по сравнению с контрольной группой наблюдается в ответ на оба типа исследуемых микроорганизмов уже через 1 час после начала инкубации (все $p < 0,01$). Агрегация гемоцитов в присутствии *E. coli* и *P. frederiksbergensis* наблюдается в диапазоне от 30 до 80 % гемоцитов в агрегате, в то время как в контроле – от 5 до 30 %.

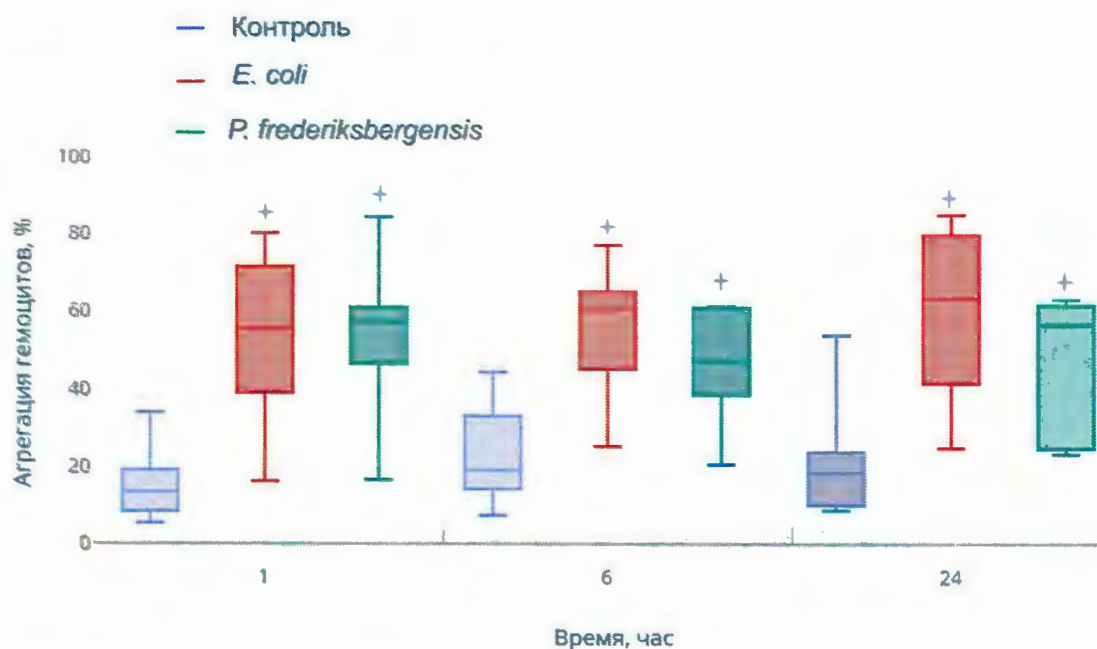


Рис. 5 Агрегация гемоцитов при внесении в среду штаммов *E. coli* и *P. frederiksbergensis*.
+ - статистически значимое различие $p < 0,01$

Таким образом, в данной работе была оценена иммунная реакция эндемичных байкальских видов амфипод на разнообразные штаммы микроорганизмов. Несмотря на использование штамма *P. frederiksbergensis*, выделенного из собственной гемолимфы *E. verrucosus*, наблюдали выраженный иммунный ответ схожий с иммунным ответом на *E. coli*, штаммом, не встречающимся в организме амфипод. Проведённый анализ показывает, что первичная культура гемоцитов, выделенная из амфипод является наиболее чувствительной для оценки иммуногенности на инородные объекты. Это открывает новые возможности для изучения особенностей иммунного ответа амфипод и проведения исследования симбиотических отношений амфипод с эндосимбионтами.

Таблица 1

	Гемолимфа, шт.	Смыв, шт.
<i>Pseudomonas sp.</i>	179	42
<i>Microbacterium sp.</i>	-	2
<i>Rhodococcus sp.</i>	15	13
<i>Kocuria rhizopila</i>	1	-
<i>Sphingobacterium sp.</i>	-	1
<i>Pseudoclavibacter sp.</i>	-	1
не определён	26	17
на определении	5	9
общее количество	226	85

7. Предполагаемое использование результатов, в том числе в учебном процессе

Полученные результаты являются не только фундаментальными исследованиями, но и имеют практическое значение. В данной работе был разработан эффективный инструмент, с помощью которого может быть оценена иммунная реакция эндемичных байкальских видов амфипод на разнообразные чужеродные объекты. Выделенные штаммы бактерий, которые могут жить в гемолимфе ракообразных в высоких концентрациях без инициирования иммунного ответа, являются ценным биотехнологическим ресурсом.

8. Перечень публикаций^(**) по результатам работы (статьи, доклады) с приложением оттисков или рукописей, направленных в печать

1. Имплантируемые полиэлектролитные микросенсоры как инструмент для прижизненной динамической диагностики физиологического состояния

- ракообразных и оценка их влияния на организм/Щапова Е.П., Назарова А.А., Гурков А.Н., Дмитриев И.А.// Международный научный форум «Ломоносов-2019», Москва Россия, 8-12 апреля 2019. - С. 1-2;
2. Оценка влияния имплантируемых полиэлектролитных микросенсоров на организм *Eulimnogammarus verrucosus*/ Щапова Е.П., Назарова А.А., Гурков А.Н., Дмитриев И.А., Ржечицкий Я.А.// II Международная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых “Социально-экологические проблемы байкальского региона и сопредельных территорий”, 22 апреля, Иркутск – С. 1-2;
 3. Изучение иммуногенности полиэлектролитных микрокапсул в первичной культуре гемоцитов амфипод/ Назарова А. А., Гурков А. Н., Щапова Е. П., Тимофеев М. А. // Биология – наука XXI века: 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. 15 - 19 апреля 2019 г., Пущино. Сборник тезисов, 2019. – С. 56-57.

Исполнитель НИР по гранту Щапова Е.П. ИГУ (Ф.И.О.)
(подпись)

* Аннотированные отчеты будут размещены на сайте ИГУ

** Учитываются только публикации со ссылкой на финансовую поддержку ИГУ