

УДК 612.017.11:593.9:575.852.112

К. А. Пухов, М. А. Баженова, А. В. Жахов, И. В. Лямина, А. Н. Сухачев,  
А. С. Трулев, Г. П. Диже, И. В. Кудрявцев

## РОЛЬ С3А-КОМПОНЕНТА КАСКАДА КОМПЛЕМЕНТА В АКТИВАЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ИГЛОКОЖИХ

### Введение

К компонентам каскада комплемента относится более 36 сывороточных и мембрально-ассоциированных белков, которые играют ведущую роль в реализации защитных реакций организма. У позвоночных животных функции каскада не сводятся к участию в реакциях врожденного иммунитета, поскольку к их числу относится и регуляция реакций приобретенного иммунитета, репаративных и регенерационных процессов [1]. Для анализа всего разнообразия функций каскада комплемента, равно как и понимания взаимосвязи между отдельными его компонентами, необходим эволюционный анализ, позволяющий изучить роль отдельных элементов системы на различных этапах становления. Каскад комплемента, становление которого связано с появлением первых вторичнородных животных, является одним из древнейших эффекторных механизмов защитных реакций [2]. Поэтому компоненты альтернативного каскада — самого древнего из каскадов активации системы комплемента — обнаружены уже у представителей иглокожих (*Echinodermata*), претендующих на роль древнейших вторичнородных.

Сравнительно недавно в активированных липополисахаридами целомоцитах морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* были обнаружены белки, гомологичные фактору В и С3-компоненту млекопитающих [3, 4]. Дальнейшие исследования показали, что иглокожие обладают архаичной системой, которая может рассматриваться в качестве предковой по отношению к каскадам комплемента более высоко организованных групп вторичнородных животных [5]. Основной функцией системы комплемента иглокожих является опсонизация патогена, которая приводит к усилению фагоцитарной активности циркулирующих клеток. Совместная инкубация частиц зимозана и целомической жидкости морских ежей сопровождалась усилением фагоцитоза, причем этот эффект отмечался после обработки целомической жидкости моноклональными антителами против SpC3 (гомолог белка С3 человека). Аналогичные результаты достигались путем инактивации тиоэфирного сайта при помощи различных химических реагентов [6].

До настоящего времени у иглокожих не описаны рецепторы (CR) к компонентам комплемента, однако с использованием функциональных тестов на поверхности фагоцитов морского ежа *S. droebachiensis* предсказано наличие рецепторов для С3b (CR1) и С3bi (CR3) [7, 8], что подтверждалось действием ингибиторов комплемента человека, устранивших опсонирующе действие целомической жидкости. Кроме того, в аминокислотной последовательности SpC3 обнаружены сайты, гомологичные участкам связыва-

---

© К. А. Пухов, М. А. Баженова, А. В. Жахов, И. В. Лямина, А. Н. Сухачев, А. С. Трулев, Г. П. Диже, И. В. Кудрявцев, 2011

ния С3 человека с рецепторами CR1 и CR3 на поверхности фагоцитирующих клеток, а также высоко консервативные участки, принимающие участие в образовании активных сайтов С3-конвертазы, с которыми связана активация последующих компонентов каскада [4]. Присутствие последовательности RS, необходимой для расщепления фактором В на N-конце а-цепи SpC3, позволяет предполагать наличие хематрактантных свойств у отщепляемого малого фрагмента С3, в составе которого обнаружен сайт TSR для взаимодействия с рецептором для С3а и шесть остатков цистеина, хотя положение только двух из них соответствует таковому в С3а млекопитающих [9]. Однако до настоящего времени попыток выделения и исследования функциональной активности С3а-подобного белка иглокожих не предпринималось. Вместе с тем у других представителей вторично-ротых беспозвоночных — асцидий *Halocynthia roretzi* и *Ciona intestinalis* — обнаружены не только С3а-подобные молекулы, но и описан рецептор для данных пептидов [10]. На N-конце а-цепи AsC3 находится последовательность для связывания с сериновыми протеазами [11]. Расщепление происходит по сайту 757ArgSer758, который обнаруживается уже у SpC3 морских ежей [4]. Строение отщепляемого фрагмента напоминало С3а, вместе с тем в отличие от С3а позвоночных только 4 остатка С находились в консервативных положениях. Кроме того, последовательность LXLAR, отвечающая у позвоночных за взаимодействие с рецепторами для анафилатоксинов, была замещена VSR. У асцидии *C. intestinalis* было обнаружено два гена, кодирующие С3, которые также были лишены этой консервативной последовательности (у С3-1 она была замещена на QGR, а у С3-2 — на QKR) [12]. Тем не менее низкомолекулярный фрагмент С3-1 был способен проявлять свойства анафилатоксина *in vitro*, в частности вызывать активацию и хемотаксис гемоцитов асцидии [13]. Таким образом, анализ данных литературы позволяет предполагать, что по аналогии с млекопитающими и асцидиями, у иглокожих существуют подобные механизмы формирования молекул, обладающих свойствами анафилатоксинов. Именно поэтому целью данной работы было исследование роли С3а-компонента каскада комплемента в регуляции функциональной активности целомоцитов — полифункциональных циркулирующих клеток морской звезды *Asterias rubens*.

### Материалы и методы исследования

**Выделение целомоцитов *Asterias rubens*.** В качестве объекта исследования были выбраны целомоциты морской звезды *Asterias rubens* (отр. Forcipulata, кл. Asteroidea, т. Echinodermata). Сбор экспериментальных животных производили в июне, июле и августе 2009–2010 гг. на базе Беломорской биологической станции им. акад. О. А. Скарлато ЗИН РАН. Забор целомической жидкости с циркулирующими клетками осуществляли стерильным одноразовым шприцем объемом 10 мл с иглой 0,6·25 мм, содержащим 0,5 мл тридецимолярного раствора ЭДТА (Нева-Реактив, Россия). Образцы центрифугировали при 100 г в течение 7 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в растворе Дальбекко без  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  с осмотичностью 24%. Подсчет клеток проводили в гемоцитометре Горяева при увеличении в 200 $\times$ . Для экспериментов *in vitro* использовали полную культуральную среду (ПКС), составленную на основе RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением  $\text{NaCl}$  до 24%, 10%-ной стерильной пулированной сыворотки *A. rubens*, 10 мМ HEPES (Биолот, Россия), 2 мМ L-глютамина и 80 мкг/мл гентамицина (ПанЭко, Россия).

**Выделение компонента комплемента человека С3а.** Свежеполученная кровь донора инкубировалась при 30 $^{\circ}\text{C}$  в течение 30 мин. Образовавшийся тромб удалялся

путем центрифугирования при 900 г и 4°C в течение 30 мин. Повторное центрифугирование проводилось для удаления эритроцитов. Далее добавлялись ε-аминокапроновую кислоту (ЕАСА) до финальной концентрации 1 М, после инкубации — 0,5 г зимозана дрожжей (или инулина) на 100 мл сыворотки при комнатной температуре. Затем проводили инкубацию при 37°C в течение 1 ч. Терминация реакции активации комплемента проходила добавлением 5 мл ледяной уксусной кислоты (ЛУК) на 100 мл сыворотки (рН 5,5). Взвесь зимозана (инулина) удаляли путем центрифугирования при 900 г и 4°C в течение 1 ч. Для выделения С3а человека применяли аффинную хроматографию на колонке с CNBr-Sepharose 4B (Sigma, США), регенерированную 40%-ным этиленгликолем и 1,5 М NaCl, дегазированную, с моноклональными антителами против С3а человека (любезно предоставлены ФГУП «ГосНИИ ОЧБ» ФМБА России). Плазма крови после реакции с зимозаном в объеме 75 мл с финальными концентрациями ЕАСА 1М, EDTA 0,5М, а также с добавлением 375 мкл PMSF и 150 мкл 10%-ным NaN<sub>3</sub>, наносилась на колонку со скоростью 70, затем 25 мл/ч. Элюция проводилась со скоростью 90 мл/ч градиентным буфером: 5 mM трикс, 0,02%-ным NaN<sub>3</sub> — 5 mM трикс, 0,02%-ным NaN<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 7,7. Полученные фракции с С3а подвергались ультрафильтрации на мемbrane PM-5 (Amicon, США) и дальнейшему диализу против 20 mM трикс с 0,02%-ным NaN<sub>3</sub>. Методами иммуноферментного анализа определяли концентрации полученных препаратов белков, которые использовали для проведения функциональных тестов. Для приготовления рабочих растворов С3а использовали ПКС.

**Определение уровня продукции активных форм кислорода целомоцитами методом сканирующей флуориметрии.** Рабочий раствор дигидрородамина 123 (34,6 мкг/мл, Sigma Aldrich, США) готовили непосредственно перед началом эксперимента, добавляя 50 мкл раствора дигидрородамина 123 (1 мг в 2,89 мл ДМСО, Sigma Aldrich, США) к 450 мкл полной питательной среды. Клеточную суспензию (3 · 106 целомоцитов / 1 мл питательной среды) вносили по 200 мкл в 96-луночный плоскодонный планшет (Sarstedt, Германия). Затем добавляли по 11 мкл раствора дигидрородамина-123, получая финальную концентрацию красителя 173 мкг/мл, после чего инкубировали в темноте на льду в течение 15 мин. Далее вносили стимуляторы: С3а-компонент комплемента человека в конечных концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл, а в качестве положительного контроля протекания реакции использовали форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА, Sigma Aldrich, США) с конечными концентрациями 50 и 100 пг/мл и 0,2%-ный зимозан. Затем клеточную суспензию инкубировали в течение 30 мин в темноте при физиологических условиях морской звезды (8–10°C, в атмосфере 3% CO<sub>2</sub>). После завершения инкубации надсадок удаляли путем аспирации, лунки трижды промывали избытком искусственной морской воды, образцы фиксировали путем внесения в каждую из лунок 100 мкл 4%-ного раствора параформальдегида на искусственной морской воде в течение 30 мин. После фиксации лунки планшетов тщательно отмывали дистиллированной водой от избытка фиксатора и солей. Оценку результатов проводили с применением микропланшетного флуориметра (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems, США) при длине волны возбуждения 485 нм, эмиссии — 538 нм, с масштабным коэффициентом 0,337/0,36, временем анализа одной лунки 20 мс, и выражали результаты в относительных единицах флуоресценции.

**Определение уровня продукции активных форм кислорода целомоцитами методом проточной цитофлуориметрии.** В качестве флуоресцентного красителя использовали дигидрородамин-123. В предварительно охлажденные пробирки вносили по 350 мкл клеточной суспензии (1 · 106 целомоцитов в 1 мл ПКС), далее добавляли по 30 мкл

рабочего раствора дигидрородамина-123 (34,6 мкг/мл) и инкубировали в темноте на льду в течение 10 мин. По завершении инкубации в опытные образцы вносили стимуляторы: С3а-компонент комплемента человека в конечных концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл, в качестве положительного контроля протекания реакции использовали ФМА в конечной концентрации 50 нг/мл, а контрольные образцы оставляли на льду до завершения эксперимента. После завершения часовой инкубации образцы отмывали от красителя (300g, 7 мин) избыtkом искусственной морской воды, содержащей 15 мМ ЭДТА. Далее переводили образцы в искусственную морскую воду и фиксировали равным объемом 8%-ного раствора параформальдегида на искусственной морской воде. До проведения цитофлуориметрического учета образцы хранили в темноте при 4°C. Анализ образцов проводили на проточном цитометре Coulter Epics Altra (Beckman Coulter, США), оснащенным аргоновым лазером с длиной волны 488 нм. Зону анализа, в которую попадали неповрежденные целомоциты, выделяли по двум параметрам: прямое, или малоугловое (FS, детектор PMT1), и боковое светорассеивание (SS, детектор PMT2). С помощью канала PMT2 оценивали интенсивность флюoresценции этих клеток в зеленой области спектра (для дигидрородамина-123 возбуждающая длина волны 488 нм, а длина волны излучения 525–530 нм) по показателю средней интенсивности свечения меченых клеток. Для получения статистически достоверных результатов в каждом из образцов анализировали не менее 15 000 клеток, число наблюдений по каждой из точек не менее 12. Анализ полученных результатов проводили, применяя программное обеспечение для анализа цитометрических данных Epics Elite Expo32 и Kaluza™ (Beckman Coulter, США).

**Оценка фагоцитарной активности целомоцитов под действием С3а человека методом проточной цитофлуориметрии.** Для изучения фагоцитарной активности целомоцитов использовали опсонизированные частицы монодисперсного полистерольного латекса с сорбированным красителем флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) диаметром 0,3 мкм ± 5% («ЛабТэк Лтд», Россия). Для опсонизации частиц применяли пулированную бесклеточную целомицкую жидкость интактных морских звезд. Опсонизацию проводили при температуре 10°C в течение 60 мин, после чего частицы латекса трижды отмывали избыtkом искусственной морской воды (600g, 15 мин). Для постановки реакции использовали 24-луночные планшеты (Sarstedt, Германия). В лунки вносили 1 мл суспензии (концентрация 3 · 106 кл/мл) целомоцитов в ПКС, объект фагоцитоза вносили из расчета 50–70 частиц на 1 целомоцит и, тщательно перемешав, инкубировали 45 мин при 10°C в темноте. После завершения инкубации содержимое лунок ресуспендировали и переносили в пробирки объемом 1,5 мл (Sarstedt, Германия). Целомоциты осаждали при 100g (Minispin, Eppendorf, Германия). Для гашения флюoresценции адгезировавших к клеточной поверхности, но не поглощенных частиц, использовали раствор трипаного синего (Биолот, Россия). Осадок переводили в охлажденный 4%-ный раствор параформальдегида на искусственной морской воде и хранили в темноте при 4°C до проведения проточной цитометрии. Анализ образцов проводили на проточном цитометре Coulter Epics Altra (Beckman Coulter, США). В качестве стимулятора фагоцитарной активности использовали С3а-компонент комплемента человека в конечных концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл. В качестве контроля применялась спонтанная (внесение равного объема изотонического раствора) фагоцитарная активность целомоцитов, инкубация которых осуществлялась в аналогичных условиях в присутствии объектов фагоцитоза. Фагоцитарный индекс, т. е. процент флюoresцирующих клеток, меченых ФИТЦ (фагоцитировавших, или связавших меченные частицы), высчитывался автоматически в программе

Epics Elite Expo32 (Coulter, Hialeah, FL, США), число наблюдений по каждой из точек не менее 12.

**Оценка уровня пиноцитоза у целомоцитов под действием С3а человека методом сканирующей флуорометрии.** В качестве объекта пиноцитоза использовали декстран с молекулярной массой 70–90 кДа (Molecular Probes, США), меченных ФИТЦ (Sigma Aldrich, США). Для этого 5 мг декстрана переводили в 1 мл децимолярного карбонатно-бикарбонатного буфера с pH 9,4–9,6 («Биолот», Россия), добавляли 50 мкл раствора ФИТЦ (1 мг/мл ДМСО), далее инкубировали в темноте при 4°C в течение 8 ч. Избытки ФИТЦ удаляли при помощи диализа против искусственной морской воды. При постановке реакции в лунки 96-луночного плоскодонного планшета (Sarstedt, Германия) вносили клеточную суспензию (3 · 106 целомоцитов в 1 мл ПКС) в объеме 100 мкл, 50 мкл стимуляторов, в качестве которых выступали С3а в конечных концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл и ФНО $\alpha$  (50 МЕ/мл) в конечной концентрации 50 МЕ, а также 10 мкл рабочего раствора декстрана (0,32 мг/мл) в ПКС. Для оценки уровня спонтанного поглощения декстрана, меченного ФИТЦ, в контрольные лунки вносили равный объем питательной среды. Время инкубации целомоцитов с объектом пиноцитоза составляло 12 ч при 10°C в атмосфере 3% CO<sub>2</sub>. По завершении инкубации лунки планшета промывали 0,0625%-ным раствором трипанового синего для удаления флуоресценции непоглощенного декстрана, после чего дважды тщательно промывали избытком стерильного изотонического раствора. Для фиксации клеток использовали 4%-ный раствор параформальдегида на искусственной морской воде. Избытки солей и фиксатора удаляли путем промывания лунок планшета дистиллированной водой. Оценку уровня продукции пиноцитоза проводили микропланшетным флуориметром (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems, США) при длине волны возбуждения 485 нм, эмиссии — 538 нм, масштабным коэффициентом 0.337/0.36, временем анализа одной лунки 20 мс. Результат выражали в относительных единицах флуоресценции.

**Оценка гемолитической активности целомоцитов под действием С3а человека методом безгелевой модификации реакции локального гемолиза.** Для изучения роли С3а человека в регуляции гемолитической активности циркулирующих клеток *Asterias rubens* был использован метод безгелевой реакции локального гемолиза по Н. К. Ерне в авторской модификации [14]. В лунки 24-луночного планшета (Sarstedt, Германия) вносили 1,5 мл клеточной суспензии в ПКС (5 · 105 целомоцитов/мл) и 100 мкл 4%-ной суспензии эритроцитов человека (ЭЧ) в стерильной морской воде. С3а использовали в финальных концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл. Время инкубации целомоцитов с ЭЧ составляло 18 ч при 10°C в атмосфере 3% CO<sub>2</sub>. По завершении инкубации лунки планшета с зонами гемолиза фотографировали цифровой камерой (Canon PowerShot G6, Япония) через бинокуляр (Leica Microsystems GmbH, Германия) с последующим подсчетом числа зон гемолиза. После фотографирования проводили оценку гемолитической активности при помощи спектрофотометрии для ресуспендированных и освобожденных центрифугированием надсадков при длине волны 405 нм, соответствующей максимуму поглощения гемоглобина. Результаты выражали в относительных единицах оптической плотности. Негативным контролем служили показатели оптической плотности ЭЧ в стерильной морской воде без внесения целомоцитов.

**Оценка направленной миграции целомоцитов.** Миграционную способность клеток оценивали при помощи одноразовых модифицированных камер Бойдена с поликарбонатной мембраной с диаметром поры 8 мкм (BD Bioscience, США). В нижние части каме-

ры вносили по 700 мкл раствора С3а в финальных концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл, а в верхние — по 200 мкл клеточной суспензии (7,5·105 целомоцитов в 1 мл). Контролем служил раствор сывороточного альбумина быка в концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл, впоследствии только в концентрации 100 нг/мл (БСА, Sigma Aldrich, США). Инкубацию проводили в течение 45 мин при физиологических условиях морской звезды. Проникшие в нижнюю часть камеры клетки фиксировали 4%-ным пароформальдегидом на искусственной морской воде. Для количественной оценки результатов экспериментов применяли инвертированный световой микроскоп (Observer D1, Karl Zeiss, Германия). Результат выражали в числе клеток в поле зрения по центру лунки, число наблюдений по каждой из точек не менее 8.

**Оценка интенсивности адгезии целомоцитов.** Для исследования роли С3а в регуляции интенсивности адгезии целомоцитов суспензии (2,5·105 целомоцитов в ПКС) в объеме 200 мкл вносили в лунки 96-луночного плоскодонного планшета (Sarstedt, Германия). После чего вносили С3а в финальных концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл, контролем служило внесение БСА средней концентрации. По завершении 90-минутной инкубации при физиологических условиях, лунки планшетов трижды промывали охлажденным до 4°C изотоническим раствором. Клетки фиксировали 4%-ным пароформальдегидом на искусственной морской воде. Количественную оценку результатов экспериментов определяли с применением инвертированного светового микроскопа Observer D1. Результат выражали в числе клеток в поле зрения по центру лунки, число наблюдений по каждой из точек не менее 6.

Для статистической обработки результатов описанных выше экспериментов применяли вычисление средних и ошибки среднего, сравнение выборок производили с помощью *t*-критерия Стьюдента.

### Результаты исследований и их обсуждение

У млекопитающих С3а обладает целым спектром провоспалительных эффектов, к числу которых относятся активация различных клеток соединительной ткани и привлечение лейкоцитов в очаг воспаления, индукция прикрепления нейтрофилов к эндотелию сосудов, дегрануляция тучных клеток, активация синтеза и секреции медиаторов воспаления и многие другие [15]. Вместе с тем в очаге проникновения патогена С3а может выполнять бактериолитические функции, проявляя свойства антимикробного пептида [16]. В сравнительно-иммунологических исследованиях основное внимание уделяется изучению роли С3а и его гомологов в регуляции функций циркулирующих клеток.

Одним из универсальных свойств анафилотоксина является способность вызывать направленную миграцию клеток. Наличие такой активности показано для С3а-подобных молекул асцидий и хвостатых амфибий [13, 17]. В ходе серии собственных экспериментов с применением модифицированных камер Бойдена было показано, что целомоциты иглокожих способны отвечать усилением миграционной активности по градиенту С3а. Для контрольных образцов (внесение БСА) число целомоцитов, проникших в нижнюю часть камеры, составляло  $44 \pm 14$  клеток. Тогда как в ответ на внесение С3а в финальных концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл в нижнюю часть камеры эти величины составляли  $146 \pm 18$  ( $p < 0,001$ ),  $90 \pm 7$  ( $p < 0,01$ ) и  $136 \pm 16$  ( $p < 0,001$ ) клеток соответственно. Полученные данные однозначно указывают на то, что С3а-компонент каскада комплемента млекопитающих способен выступать в качестве хематрактанта для целомоцитов морской

звезды. Вместе с тем длительная инкубация целомоцитов в присутствие С3а значительно повышала интенсивность адгезии клеток к субстрату. Показано, что полуторачасовая инкубация циркулирующих клеток *A. rubens* в полной питательной среде сопровождалась прикреплением ко дну лунок планшета в среднем  $34 \pm 4$  клетки в поле зрения. Тогда как внесение С3а в финальной концентрации 10 нг/мл сопровождалось почти двухкратным увеличением интенсивности адгезии (до  $65 \pm 9$  клеток в поле зрения ( $p < 0,01$ ). Использование других концентраций С3а не приводило к достоверному приросту активности клеток ( $25 \pm 5$  и  $45 \pm 6$  клеток в поле зрения для финальных концентраций 100 и 1000 нг/мл соответственно).

Помимо усиления миграционной активности С3а играет ведущую роль в активации клеток в очаге проникновения патогена. Для млекопитающих показана ключевая роль данных молекул в дегрануляции и высвобождении гистамина тучными клетками соединительной ткани [18]. В качестве модели для изучения роли С3а в процессах секреторной дегрануляции целомоцитов иглокожих был использован тест на гемолитическую активность клеток. В результате выброса гранул целомоцитами в окружающую среду высвобождается широкий спектр активных веществ, включая кислую фосфатазу и пероксидазу, обеспечивающих защиту от бактерий, грибов и многоклеточных паразитов. В лизосомах гранулярных и агранулярных амебоцитов обнаружены кислая и щелочная фосфатазы,  $\beta$ -гликозидаза, аминопептидазы, кислые и щелочные протеазы и липазы [19]. Было показано, что С3а способен усиливать высвобождение целомоцитами лизосомных ферментов, приводивших к изменению интенсивности лизиса клеток-мишней, что выражалось в увеличении оптической плотности надосадка за счет высвобождения гемоглобина из разрушенных эритроцитов. Для контрольных клеток, инкубация которых проводилась в отсутствие С3а, оптическая плотность (ОП) надосадочной жидкости составляла  $0,206 \pm 0,002$  ед. ОП. Инкубация целомоцитов в присутствие С3а в концентрации 1000 нг/мл не приводила к изменению гемолитической активности клеток. Тогда как применение С3а в концентрациях 10 и 100 нг/мл приводило к достоверному увеличению гемолиза до  $0,215 \pm 0,002$  ( $p < 0,01$ ) и  $0,212 \pm 0,003$  ед. ОП ( $p < 0,01$ ) соответственно.

Способность к продукции супероксидамина и перекисных соединений является одним из универсальных механизмов врожденного иммунитета у животных разных таксонов [20]. В системе защитных реакций млекопитающих С3а-компонент каскада комплемента играет существенную роль в регуляции фагоцитоза и кислородного метаболизма фагоцитов. Уже у представителей костных рыб — радужной форели *Onchorhyncus mykiss* — показана ведущая роль продуктов ограниченного протеолиза С3 и С5 в увеличении уровня продукции активных форм кислорода нейтрофилами [21]. Для исследования роли С3а в регуляции кислородного метаболизма целомоцитов морских звезд были применены два методологических подхода: проточной цитометрии и сканирующей флуориметрии.

При определении уровня продукции активных форм кислорода в качестве положительного контроля использовали ФМА [22]. Для оценки влияния С3а на уровень продукции АФК целомоцитами морских звезд измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (X Mean) клеток после реакции с дигидрородамином-123. Показано, что внесение С3а достоверно увеличивало продукцию активных форм кислорода по сравнению с клетками, стимулированными ФМА ( $71,42 \pm 3,15$  единиц флуоресценции). Для С3а в концентрации 10 нг/мл эта величина составила  $80,13 \pm 3,72$  ( $p < 0,01$ ), а для концентраций 100 и 1000 нг/мл —  $80,30 \pm 2,72$  ( $p < 0,01$ ) и  $83,65 \pm 3,82$  ( $p < 0,001$ ) единиц флу-

оресценции соответственно (указана средняя интенсивность флуоресценции для 15 000 клеток).

В ходе серии аналогичных экспериментов с использованием методов сканирующей флуориметрии было показано, что С3а-компонент комплемента в конечных концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл достоверно ( $p < 0,01$ ) повышал продукцию АФК целомоцитами до  $0,1798 \pm 0,0211$ ,  $0,1644 \pm 0,0199$  и  $0,1695 \pm 0,0183$  относительных единиц флуоресценции (ОЕФ) соответственно, по сравнению с контролем ( $0,0897 \pm 0,0073$  ОЕФ). В этой серии опытов в качестве положительного контроля за протеканием реакции использовали ФМА с конечными концентрациями 50, 100 пг/мл и 0,2%-ный зимозан, которые увеличивали продукцию АФК с изменением интенсивности флуоресценции до  $0,1695 \pm 0,0204$  ( $p < 0,01$ ),  $0,1619 \pm 0,0205$  ( $p < 0,01$ ) и  $0,1677 \pm 0,0173$  ОЕФ ( $p < 0,01$ ) соответственно.

Помимо увеличения уровня продукции активных форм кислорода в моноцитах и нейтрофилах млекопитающих, анафилатоксины принимают участие в регуляции фагоцитарной активности клеток в очаге воспаления [15]. На эволюционную древность этой функции данных молекул указывают результаты исследования, проведенные на лейкоцитах костных рыб, когда была продемонстрирована ведущая роль гомологов С3а, С4а и С5а в увеличении фагоцитарной активности клеток [23]. В ходе собственных исследований была предпринята попытка оценить влияние С3а на способность целомоцитов *A. rubens* к фагоцитозу и пиноцитозу. Применение проточной цитометрии показало, что внесение С3а в концентрациях 10, 100, 1000 нг/мл достоверно повышало фагоцитарную активность целомоцитов морских звезд по сравнению с контролем. В контрольных образцах число ФИТЦ-позитивных клеток не превышало в  $70,42 \pm 1,51\%$ , тогда как для клеток, инкубация которых проводилась в присутствии С3а (в концентрациях 10, 100 и 1000 нг/мл), данные величины составляли  $76,30 \pm 2,50\%$  ( $p < 0,01$ ),  $87,33 \pm 1,53\%$  ( $p < 0,001$ ) и  $88,70 \pm 1,18\%$  ( $p < 0,001$ ) соответственно. В качестве положительного контроля были использованы препараты ФНОа (фактор некроза опухолей в концентрациях 10 и 50 МЕ/мл), применение данного стимулятора приводило к увеличению фагоцитарной активности клеток на 7–8%. Анализ распределения клеток по прямому и боковому светорассеянию на фоне внесения в культуры С3а в концентрации 1 мкг/мл выявил формирование популяции крупных клеток, обладавших высокой фагоцитарной активностью. Полученные результаты согласуются с данными литературы о способности агранулярных амебоцитов иглокожих обратимо формировать синцитии при гиперактивации [24].

Параллельно с повышением фагоцитарной активности целомоцитов С3а усиливал и их способность к пиноцитозу. Методом сканирующей флуориметрии показано, что внесение С3а в конечных концентрациях 10, 100, 1000 нг/мл достоверно ( $p < 0,01$ ) повышало пиноцитарную активность целомоцитов, которая выражалась в увеличении флуоресценции на величины  $0,1273 \pm 0,0015$ ,  $0,1297 \pm 0,0018$  и  $0,1270 \pm 0,0018$  ОЕФ соответственно, в то время как для положительного контроля в виде ФМВ и 50 МЕ/мл ФНОа эти величины составили  $0,1275 \pm 0,0022$  и  $0,1279 \pm 0,0014$  ОЕФ. Спонтанный же пиноцитоз выражался величиной  $0,1240 \pm 0,0008$  ОЕФ.

## Заключение

Таким образом, полученные в ходе проведенных экспериментов результаты позволяют предполагать, что уже на ранних этапах становления каскад комплемента совмещал не только функции распознавания и опсонизации патогена, но и активации кле-

точного звена врожденного иммунитета, реализуемого за счет продуктов ограниченного протеолиза молекул-опсонинов. При этом функции протеолитических фрагментов не ограничивались привлечением в очаг проникновения патогена циркулирующих фагоцитов, так как они принимали непосредственное участие в активации этих клеток с целью повышения эффективности клеточного ответа. На примере молекулы С3а млекопитающих было показано, что целомоциты иглокожих обладают широким спектром эффекторных защитных механизмов элиминации патогенов, включающих фаго- и пиноцитоз, способность к продукции активных форм кислорода и высвобождению лизосомных ферментов, адгезии и направленной миграции. При этом ксеногенные компоненты каскада комплемента способны оказывать регуляторное воздействие на эти клеточные реакции, что позволяет предполагать наличие на поверхности целомоцитов рецепторов, гомологичных рецепторам С3а млекопитающих. В настоящее время подобные рецепторы выделены у представителей оболочников, костных рыб и амфибий, что однозначно указывает на эволюционную древность и консервативность функций анафилотоксинов в регуляции защитных и воспалительных реакций [25].

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант N 08-04-00111а).

## Литература

1. Rutkowski M. J., Sughrue M. E., Kane A. J., Ahn B. L. et al. The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration // Inflamm. Res. 2010. Vol. 59, N 11. P. 897–905.
2. Nonaka M., Kimura A. Genomic view of the evolution of the complement system // Immunogenetics. 2006. Vol. 58, N 9. P. 701–713.
3. Smith L. C., Shin C. S., Dachenhausen S. G. Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system // J. Immunol. 1998. N 161. P. 6784–6793.
4. Al-Sharif W. Z., Sunyer J. O., Lambris J. D., Smith L. C. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3 // J. Immunol. 1998. N 160. P. 2983–2997.
5. Smith L. C., Clow L. A., Terwilliger D. P. The ancestral complement system in sea urchins // Immunol. 2001. N 180. P. 16–34.
6. Clow L. A., Raftos D. A., Gross P. S., Smith L. C. The sea urchin complement homologue, SpC3, functions as an opsonin // J. Exp. Biol. 2004. N 207. P. 2147–2155.
7. Bertheussen K. Receptors for complement on echinoid phagocytes. II. Purified human complement mediates echinoid phagocytosis // Dev. Comp. Immunol. 1982. N 6. P. 635–642.
8. Bertheussen K., Seljelid R. Receptors for complement on echinoid phagocytes. I. The opsonic effect of vertebrate sera on echinoid phagocytosis // Dev. Comp. Immunol. 1982. N 6. P. 423–431.
9. Smith L. C. Thioester function is conserved in SpC3, the sea urchin homologue of the complement component C3 // Dev. Comp. Immunol. 2002. N 26. P. 603–614.
10. Melillo D., Sfyroera G., De Santis R., Graziano R. et al. First identification of a chemotactic receptor in an invertebrate species: structural and functional characterization of *Ciona intestinalis* C3a receptor // J. Immunol. 2006. N 177. P. 4132–4140.
11. Nonaka M., Azumi K., Ji X., Namikawa-Yamada C. et al. Opsonic complement component C3 in the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi* // J. Immunol. 1999. N 162. P. 387–391.
12. Marino R., Kimura Y., De Santis R. et al. Complement in urochordates: cloning and characterization of two C3-like genes in the ascidian *Ciona intestinalis* // Immunogenetics. 2002. Vol. 53, N 12. P. 1055–1064.
13. Pinto M. R., Chinnici C. M., Kimura Y., Melillo D. et al. CiC3-1a-mediated chemotaxis in the Deuterostome invertebrate *Ciona intestinalis* (Urochordata) // J. Immunol. 2003. N 171. P. 5521–5528.
14. Сухачев А. Н., Кудрявцев И. В., Николаев К. Е., Галактионов К. В. и др. Влияние лектинов

различной углеводной специфичности на гемолитическую активность гемоцитов мидии *Mytilus edulis* // «Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов европейского Севера». 2009. Петрозаводск: КарНЦ РАН. С. 538–542.

15. *Haas P.J., van Strijp J.* Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation // *Immunol. Res.* 2007. Vol. 37, N 3. P. 161–175.

16. *Pasupuleti M., Walse B., Nordahl E.A., Morgelin M.* et al. Preservation of antimicrobial properties of complement peptide C3a, from invertebrates to humans // *JBC*. 2007. Vol. 282, N 4. P. 2520–2528.

17. *Shimazaki Y., Maeyama K., Fujii T.* Isolation of the third component of complement and its derivative with anaphylatoxin-like activity from the plasma of the newt *Cynops pyrrhogaster* // *Dev. Comp. Immunol.* 2001. N 25. P. 467–474.

18. *Walport M.J.* Complement. First of two parts // *N. Engl. J. Med.* 2001. N 344. P. 1058–1066.

19. *Canicatti C.* Lysosomal enzyme pattern in *Holothuria polii* coelomocytes // *J. Invert. Pathol.* 1990. Vol. 56, №1. P. 70–74.

20. *Beutler B.* Innate immunity: an overview // *Mol. Immunol.* 2004. N 40. P. 845–859.

21. *Rotllant J., Parra D., Peters R.* et al. Generation, purification and functional characterization of three C3a anaphylatoxins in rainbow trout: role in leukocyte chemotaxis and respiratory burst // *Dev. Comp. Immunol.* 2004. Vol. 28, N 7–8. P. 815–828.

22. *Coteur G., Warnau M., Jangoux M., Dubois P.* Reactive oxygen species (ROS) production by amoebocytes of *Asterias rubens* (Echinodermata) // *Fish Shellfish Immunol.* 2002. N 12. P. 187–200.

23. *Lia J., Petersa R., Lapatrab S.* et al. Anaphylatoxin-like molecules generated during complement activation induce a dramatic enhancement of particle uptake in rainbow trout phagocytes // *Dev. Comp. Immunol.* 2004. N 28. P. 1005–1021.

24. *Johnson P.T.* The coelomic elements of the sea urchins (*Strongylocentrotus*). III. In vitro reaction to bacteria // *J. Invert. Pathol.* 1969. Vol. 13, N 1. P. 42–62.

25. *Boshra H., Wang T., Hove-Madsen L.* et al. Characterization of a C3a receptor in rainbow trout and *Xenopus*: the first identification of C3a receptors in nonmammalian species // *J. Immunol.* 2005. N 175. P. 2427–2437.

Статья поступила в редакцию 20 декабря 2010 г.