

Injections of Encapsulated pH Sensor SNARF-1 do not Induce Apparent Stress Reaction in Larvae of Endemic Baikal Caddisflies *Baicalina thamastoides*

A.N. Gurkov^{1*}, I.A. Belousova^{1,2}, E.P. Shchapova¹, B.K. Baduev¹,
K.P. Vereshchagina¹, M.A. Timofeyev¹

¹ Institute of Biology at ISU, 664003, Irkutsk, Karl Marx str., 1, Russia

² Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630091, Novosibirsk, Frunze str. 11, Russia

*E-Mail: a.n.gurkov@gmail.com

Received November 27, 2015

In the present study possibility of stress reaction of larvae of caddisflies *Baicalina thamastoides* Martynov, 1914 to injection of encapsulated sensors has been assessed. Activities of superoxide dismutase, non-specific esterases and glutathione S-transferase, which play important roles in functioning of organism defense systems, were used as biomarkers. Enzyme activities were measured after injections of empty microcapsules and microcapsules with fluorescent pH sensor SNARF-1, as well as after injections of physiological saline solution and solution of the fluorescent sensor. Obtained results argue for nontoxicity and no apparent stress reaction of antioxidant and detoxification systems of *B. thamastoides* larvae to both types of microcapsules.

Key words: antioxidant defense, Baikal, microcapsules, Trichoptera

Микрокапсулы являются не только перспективным средством целевой доставки генно-модифицирующих векторов и лекарственных средств в ткани живого организма, но и могут быть использованы как носители широкого круга молекулярных сенсоров, спектр или яркость флуоресценции которых реагирует на такие параметры как pH, ионный состав и т. д. (Johnson & Spence, 2011). Микрокапсулы, наполненные флуоресцентными сенсорами и введённые в живой организм, являются перспективным инструментом для прижизненной оценки стрессовых состояний организма и могут найти широкое применение в экологическом мониторинге водных экосистем (Sadovoy *et al.*, 2012). Однако, введение микрокапсул в организм для регистрации физиологических параметров само по себе может сопровождаться реакцией защитных систем организма на введённые микрокапсулы, что может помешать адекватной оценке состояния организма с помощью микрокапсул. Это обуславливает необходимость предварительной оценки возможной стресс-реакции организмов на инъекции микрокапсул, особенно у видов, перспективных для использования в качестве тест-объектов.

Озеро Байкал — это крупнейший резервуар пресной воды на планете, а также наиболее древняя и разнообразная из существующих открытых пресноводных экосистем (Martens, 1997). Последние оценки состояния экосистемы озера свидетельствуют о том, что глобальное изменение

климата и деятельность человека оказывают на неё существенное воздействие (Timoshkin *et al.*, 2015; Moore *et al.*, 2009). Это обуславливает необходимость развития и улучшения существующих программ мониторинга экосистемы Байкала. Особого внимания заслуживает бентосная зона озера, в которой сосредоточена основная часть эндемичного биоразнообразия Байкала (Timoshkin *et al.*, 2015; Bajkalovedenie (Baicalogy), 2012). Одной из групп, формирующих значительную долю биомассы бентосной зоны Байкала, являются эндемичные ручейники (Trichoptera), обильно представленные в литорали личиночными стадиями. Личинки ручейников зачастую обладают сравнительно низкой устойчивостью к стрессовым факторам среды и поэтому могут использоваться в качестве высокочувствительных тест-объектов для токсикометрической оценки и в экологическом мониторинге водоёмов (Hodkinson & Jackson, 2005).

В данной работе оценивали возможность развития стресс-ответа организма личинки ручейника при инъекции инкапсулированных сенсоров. В качестве стресс-маркера были использованы показатели активности трёх ферментов, играющих ключевую роль в функционировании защитных систем организма: супероксиддисмутазы (СОД), неспецифических эстераз (НЭ) и глутатион-S-трансферазы (ГСТ). СОД — это один из ключевых ферментов, ответственных за утилизацию активных форм

кислорода, чья продукция в митохондриях увеличивается при множестве нарушений в организме. ГСТ и НЭ являются одними из основных ферментов системы детоксикации ксенобиотиков.

Активность ферментов оценивали в ответ на инъекции пустых микрокапсул и микрокапсул, содержащих флуоресцентный pH-сенсор SNARF-1. Также проводили оценку в ответ на инъекции физиологического раствора и раствора флуоресцентного сенсора.

MATERIALS AND METHODS

Подготовка микрокапсул

Микрокапсулы подготавливали методом наслаения противоположно заряженных полимеров. Вначале получали пористые ядра карбоната кальция, смешивая 0,625 мкл 1М раствора Na_2CO_3 и 0,625 мкл 1М раствора CaCl_2 с 2 мл раствора декстрана, меченого чувствительным к pH флуоресцентным красителем SNARF-1 (Invitrogen, D-3304), с концентрацией 2 мг/мл, при интенсивном перемешивании. Через 10 с перемешивания полученные ядра карбоната кальция три раза отмывали осаждением с помощью центрифугирования и разведением в деионизированной воде. Поры ядер, сформированных в растворе меченого SNARF-1 декстрана, содержали данный краситель. Затем на ядра последовательно наносили слои положительно заряженного полимера полиаллиламин гидрохлорида (ПАГ; Aldrich, 2832315) и отрицательно заряженного полистиролсульфоната натрия (ПСН; Aldrich,

243051). Для этого ядра помещали в раствор соответствующего полимера с концентрацией 4 мг/мл (содержащий также 1М NaCl) на 5 мин при ультразвуковом воздействии для снижения агрегации ядер. Ядра трижды отмывали от раствора оставшегося полимера, после чего наслаивали второй полимер, а затем повторяли процедуру несколько раз. Для повышения биосовместимости покрывали полученные структуры дополнительным слоем сополимера поли-L-лизина и полиэтиленгликоля (ПЛЛ-ПЭГ; SuSoS, SZ34-67), экспонируя ядра в растворе данного полимера с концентрацией 2 мг/мл в течение двух часов. Наконец, ядра из карбоната кальция растворяли в 0,1М растворе ЭДТА с pH 7.0, после чего получали полые микрокапсулы с формулой стенки $(\text{ПАГ/ПСН})_5\text{-}(\text{ПЛЛ-ПЭГ})$, содержащие SNARF-1. Поскольку SNARF-1 ковалентно связан с декстраном, он не может покинуть полость микрокапсулы. Пустые капсулы получали аналогично, но без добавления меченого SNARF-1 декстрана при формировании ядер.

Измерение концентрации микрокапсул проводили в камере Горяева. Концентрации микрокапсул в растворах, использованных позже для инъекций, были доведены примерно до 6700 шт/мкл и 67000 шт/мкл для содержащих и не содержащих SNARF-1 микрокапсул соответственно. Данные концентрации выбраны, поскольку микрокапсулы с декстраном, меченым SNARF-1, оказались примерно в 5 раз крупнее микрокапсул без него (в среднем 5 мкм и 1 мкм соответственно) из-за различий в размерах

кристаллизовавшихся ядер карбоната кальция. При выбранных концентрациях растворы микрокапсул обладают близкими суммарными площадями поверхности микрокапсул.

Отлов ручейников и проведение экспериментов

В качестве объекта данного исследования были выбраны личинки массового эндемичного вида ручейников *Baicalina thamastoides* Martynov, 1914, населяющие литоральную зону озера Байкал. Отлов производили с глубины 2-3 м в прибрежной зоне озера Байкал в п. Большие Коты в сентябре 2015 г. Вид определяли по (Timoshkin, 2004; Lerneva, 1964). Отловленные личинки ручейников были прикреплены к мелким валунам в тех местах, где отсутствовало обрастание водорослями. Температура отлова — 12 °С, при данной температуре животных содержали и проводили все последующие эксперименты. После отлова личинки ручейников были акклимированы к лабораторным условиям в течение 4-5 суток: их содержали в холодильнике в аквариумах по 2-3 л в хорошо аэрируемой байкальской воде при низком освещении. В аквариумы помещали небольшие валуны, схожие по форме с теми, к которым ручейники были прикреплены в естественной среде. Важно отметить, что покидание домиков личинками, свидетельствующее о стрессовом состоянии ручейника, в течение акклимации не наблюдали. При проведении экспериментов использовали только личинок без внешних паразитов и симбионтов.

Для проведения эксперимента ручейники были

разделены на 5 групп: контрольная группа, оставленная в условиях акклимации, и 4 экспериментальные тест-группы. В жировые тела ручейников тест-групп делали инъекции, сопровождавшиеся последующим экспонированием животного под объективом флуоресцентного микроскопа Микмед-2 (ЛОМО) с зелёным освещением в течение около 30 с. Данное экспонирование имитировало процесс снятия сигнала с флуоресцентных сенсоров в тканях ручейника. Инъекции в личинки ручейников были следующих типов: введение физиологического раствора, введение «пустых» микрокапсул в физиологическом растворе, введение микрокапсул с флуоресцентным pH-чувствительным красителем SNARF-1, введение меченого SNARF-1 декстрана в физиологическом растворе. Концентрация декстрана, меченого SNARF-1, в физиологическом растворе составляла 0,2 мг/мл, что соответствует средней молярной концентрации SNARF-1, используемой для измерения pH на культурах клеток (Venn *et al.*, 2009). Инъекции производили с помощью шприца на 100 мкл (Hamilton) с насаженной иглой с внешним диаметром 0,25 мм.

Перед инъекцией по центру длины домика личинки с латеральной стороны в нём делали отверстие размером 2-3 мм, мягко откалывая песчинку пинцетом. Через это отверстие под углом примерно 30 ° вводили 2 мкл соответствующего раствора в латеральную часть жирового тела личинки. После проведённых процедур животных возвращали в условия акклимации. Через сутки после инъекции и экспозиции под

флуоресцентным микроскопом личинок быстро вынимали из домиков и фиксировали в жидком азоте.

Биохимические анализы

Зафиксированных в жидком азоте ручейников гомогенизировали полипропиленовым пестиком в фосфатносолевом буфере. Затем образцы центрифугировали при 10000 g 10 мин. Полученный супернатант использовали для определения активности ферментов. Активность СОД измеряли по методике (Beauchamp & Fridovich, 1971), активность НЭ — по методике (Serebrov et al., 2006), активность ГСТ — по методике (Habig et al., 1974) с модификациями (Timofeyev, 2010). Концентрацию общего белка определяли по методике Брэдфорд.

Активность СОД и НЭ измерена для 10 биологических повторностей в рамках каждой экспериментальной группы, активность ГСТ — для 4-12 биологических повторностей. Измерения проведены в трёх технических повторах для всех ферментов. Данные были проверены на соответствие нормальному распределению тестом Шапиро-Уилка, после чего логарифмированы для нормализации. Статистическую значимость различий оценивали однофакторным дисперсионным анализом. Статистический анализ проведён в пакете R (R Core Team, 2015).

RESULTS AND DISCUSSION

Полученные результаты приведены на Рис. 1. Как следует из представленных материалов и

проведённого статистического анализа, для всех трёх ферментов не отмечено наличия статистически значимых отличий между выборками (Р-значения равны соответственно 0,16, 0,9 и 0,37 для СОД, НЭ и ГСТ). В то же время, из ранее проведённых исследований на личинках ручейников известно, что экспонирование в присутствии различных токсикантов должно вызывать значительную реакцию антиоксидантной и детоксицирующей систем, в первую очередь СОД, ГСТ и экстераз (Xie et al., 2009; Berra et al., 2006). Таким образом, полученный в данной работе результат может свидетельствовать о том, что микрокапсулы (в том числе содержащие флуоресцентный краситель) нетоксичны, и их инъекции не вызывают развития стресс-реакции антиоксидантной и детоксицирующей систем у личинок ручейников *B. thumastoides*.

Следует отметить, что отсутствие токсичности микрокапсул может иметь и кратковременный характер, поскольку остается небольшая доля вероятности того, что ответ защитных систем может развиваться в другие временные точки после инъекции. Однако, в таком случае, воздействие непосредственно инъекции должно быть нивелировано через сутки содержания в условиях акклимации, в то время как ответ защитных систем на введённые в ткани микрокапсулы мог ещё не успеть развиваться.

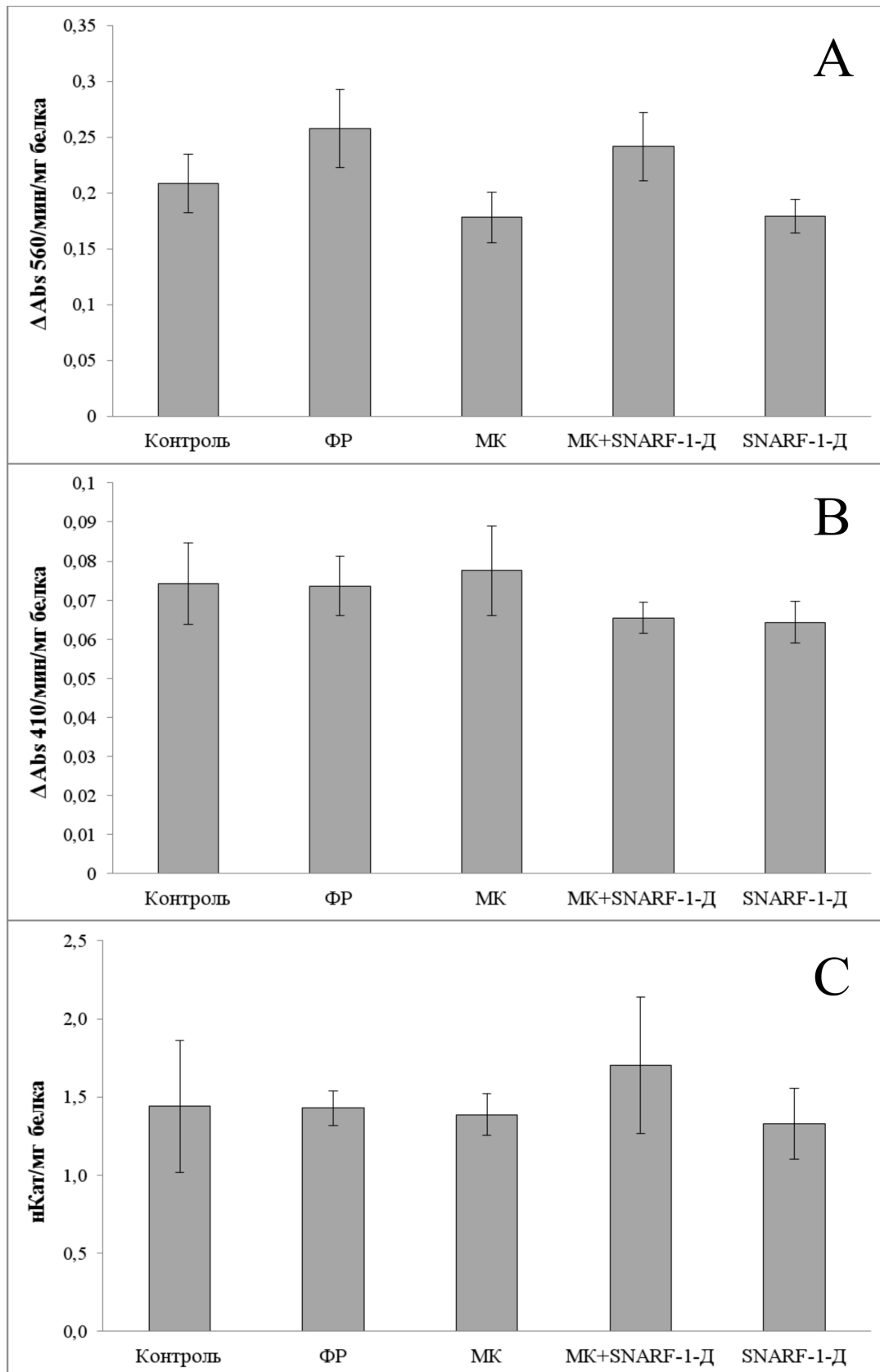


Figure 1. Активность СОД (А), НЭ (В) и ГСТ (С) в гомогенате тела личинки ручейников *B. thamastoides* в контрольной группе и через сутки после инъекции физиологического раствора (ФР), пустых микрокапсул (МК), микрокапсул с содержанием SNARF-1 (МК+SNARF-1-Д) и раствора меченого SNARF-1 декстрана (SNARF-1-Д).

CONCLUSIONS

Таким образом, предварительные результаты наших исследований свидетельствуют в пользу нетоксичности и отсутствия выраженного стресс-ответа антиоксидантной и детоксицирующей систем у личинок *B. thamastoides* как на инъекции микрокапсул и экспонирование под флуоресцентным микроскопом, так и на инъекции инкапсулированного pH-сенсора SNARF-1. Возможность отложенных хронических эффектов на организм при применении инкапсулированных сенсоров, требует дальнейшего изучения, включающего большее количество временных точек и оцениваемых параметров стресс-реакции.

ACKNOWLEDGMENT

Коллектив авторов благодарит Адельшина Р.В. за помощь в отлове личинок ручейников, а также Рожкову Н.А., Мартемьянова В.В. и Меглинского И.В. за ценные рекомендации при проведении данной работы. Работа проведена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 15-14-10008).

REFERENCES

- Bajkalovedenie (Baicalogy) (2012) Nauka, Novosibirsk. 1114 p. (In Russian).
- Beauchamp C. & Fridovich I. (1971) Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, **44(1)**, 276–287.
- Berra E., Forcella M., Giacchini R., Rossaro B. & Parenti P. (2006) Biomarkers in Caddisfly Larvae of the Species *Hydropsyche Pellucidula* (Curtis, 1834) (Trichoptera: Hydropsychidae) Measured in Natural Populations and after Short Term Exposure to Fenitrothion. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, **76(5)**, 863–70.
- Habig W.H., Pabst M.J. & Jakoby W.B. (1974) Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *J. Biol. Chem.*, **249(22)**, 7130–7139.
- Hodkinson I.D. & Jackson J.K. (2005) Terrestrial and Aquatic Invertebrates as Bioindicators for Environmental Monitoring, with Particular Reference to Mountain Ecosystems. *Environmental management*, **35(5)**, 649–66.
- Johnson I. & Spence M.T.Z. (2011) Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Life Technologies (Invitrogen), NY, USA.
- Lepneva S. G. (1964) Fauna of USSR. Caddisflies. Publishing House of Academy of Sciences, Moscow-Leningrad, USSR (In Russian)
- Martens K. (1997) Speciation in Ancient Lakes. *Trends in Ecology & Evolution*, **12(5)**, 177–182.
- Moore M.V., Hampton S.E., Izmet'eva L.R., Silow E.A., Peshkova E.V. & Pavlov B.K. (2009) Climate Change and the World's 'Sacred Sea'—Lake Baikal, Siberia. *BioScience*, **59(5)**, 405–417.
- R Core Team. (2015). R: A Language and Environment for Statistical Computing (<http://www.r-project.org>).

- Sadovoy A., Teh C., Korzh V., Escobar M. & Meglinski I. (2012) Microencapsulated Bio-Markers for Assessment of Stress Conditions in Aquatic Organisms in Vivo. *Laser Physics Letters*, **9(7)**, 542.
- Serebrov V.V., Gerber O.N., Malyarchuk A.A., Martemyanov V.V., Alekseev A.A. & Glupov V.V. (2006) Effect of Entomopathogenic Fungi on Detoxification Enzyme Activity in Greater Wax Moth *Galleria Mellonella* L. (Lepidoptera, Pyralidae) and Role of Detoxification Enzymes in Development of Insect Resistance to Entomopathogenic Fungi. *Biology Bulletin*, **33(6)**, 581–586.
- Timofeyev M.A. (2010) Ecological and Physiological Aspects of Adaptation to Abiotic Environmental Conditions of Endemic Baikalian and Palearctic Amphipods. *Thesis for Dr.Sci. degree*. Tomsk, 384. (In Russian)
- Timoshkin O.A. (2004) Index of Animal Species Inhabiting Lake Baikal and Its Catchment Area. Nauka, Novosibirsk. (In Russian).
- Timoshkin O.A., Bondarenko N.A., Volkova Y A., Tomberg I.V., Vishnyakov V.S. & Malnik V V. (2015) Mass Development of Green Filamentous Algae of the Genera *Spirogyra* and *Stigeoclonium* (Chlorophyta) in the Littoral Zone of the Southern Part of Lake Baikal. *Hydrobiological Journal*, **51(1)**, 13–23.
- Venn A.A., Tambutté E., Lotto S., Zoccola D., Allemand D. & Tambutté S. (2009) Imaging Intracellular pH in a Reef Coral and Symbiotic Anemone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106(39)**, 16574–9.
- Xie L., Flippin J.L., Deighton N., Funk D.H., Dickey D.A. & Buchwalter D.B. (2009) Mercury(II) Bioaccumulation and Antioxidant Physiology in Four Aquatic Insects. *Environmental Science & Technology*, **43(3)**, 934–940.