

**УЛАНОВА ОЛЬГА АНАТОЛЬЕВНА**

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИММУННЫХ КЛЕТОК ГОЛОТУРИИ *EUPENTASTA*  
*FRAUDATRIX* И ЕГО МОДУЛЯЦИЯ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки  
Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева  
Дальневосточного отделения Российской академии наук

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник

**Долматова Людмила Степановна**

**Официальные оппоненты:**

**Аминин Дмитрий Львович**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ

**Микряков Вениамин Романович**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина Российской академии наук, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»

Защита диссертации состоится 11 декабря 2019 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук по адресу: 690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: <http://www.wimb.dvo.ru/misc/dissertations/index.php/sovet-d-005-008-01/47-ulanova-olga-anatolevna>

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

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

*Ващенко*

Ващенко Марина  
Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Взаимодействие клеток в процессе функционирования иммунной системы определяет выраженность и точность иммунного ответа. У позвоночных выделяют контактное взаимодействие клеток и гуморальное (Ярилин, 1999; Шарова и др., 2000; Sharouri-Moghaddam et al., 2018). Гуморальное взаимодействие осуществляется воздействием на клетки-мишени сигнальных молекул, синтезируемых клетками-продуцентами. В качестве сигнальных молекул выступают цитокины и активные формы кислорода (АФК), прежде всего, перекись водорода (Costantini et al., 2011; Ткачук и др., 2012). АФК также запускают программируемую клеточную смерть (апоптоз). В фагоцитах позвоночных высокий уровень АФК в процессе иммунного ответа контролируется высокой активностью антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ)) (Подколзин и др., 2000; Wang et al., 2017). Однако наличие и механизмы взаимодействия иммунных клеток у беспозвоночных остаются мало изученными, что не позволяет выстроить целостное представление об эволюции иммунитета.

Иммунитет и механизмы его регуляции недостаточно изучены у иглокожих (Echinodermata). В то же время подробное изучение функций иммунных клеток и механизмов иммунного ответа иглокожих привело бы к пониманию происхождения врожденного иммунитета, полностью сформированного только у позвоночных. Иглокожие занимают особое место среди беспозвоночных, находясь в основании древа Deuterostomia, к которому относятся и позвоночные (Кудрявцев и др., 2005). В связи с этим предполагается, что некоторые иммунные механизмы у иглокожих и позвоночных могут быть гомологичны/аналогичны (Rast, Messier-Solek, 2008). Ключевую роль в иммунных реакциях иглокожих играют циркулирующие клетки – целомоциты, включающие несколько типов клеток, наиболее многочисленными из которых являются фагоциты (аналоги макрофагов позвоночных) и морулярные клетки (аналоги тучных клеток позвоночных) (Коренбаум, 1989; Chia, Xing, 1996; Кудрявцев, Злобина, 2004; Liao, Fugmann, 2017). Центрифугированием фагоциты голотурий и морских ежей разделяются на две фракции (Edds, 1984; Dolmatova et al., 2003), что свидетельствует о том, что они не являются гомогенной клеточной популяцией. Ряд факторов врожденного иммунитета, характерных для высших позвоночных животных, в полной мере проявляется у иглокожих. Так, в ответ на стимуляцию иммунные клетки иглокожих могут продуцировать АФК (Кудрявцев, Злобина, 2004; Zhang et al. 2017) и цитокиноподобные молекулы, сходные с интерлейкинами (ИЛ)-1 $\alpha$ , -2, -6 (Legas et al., 1996; Malagoli et al., 2010). Наличие у иглокожих функционально различных типов иммунных клеток и цитокиноподобных веществ, позволяет предполагать, что, как и у позвоночных, их иммунный ответ может осуществляться при взаимодействии клеток, особенности которого остаются невыясненными.

Исследования механизмов регуляции иммунитета у позвоночных выявили важную роль глюкокортикоидных гормонов которые, в частности, являются физиологическими индукторами апоптоза в организме (Volsky et al., 2001; Полетаева и др., 2009; Singh, Halidar, 2016). Большое количество экспериментов по изучению влияния глюкокортикоидов на иммунные клетки позвоночных животных проведено с использованием синтетического стероида (кортикостероида) дексаметазона (Dex). Показано, что дексаметазон модулирует синтез цитокинов, индукцию апоптоза иммунных клеток, увеличивая в них продукцию АФК (Персиянова и др., 1998; Herold et al., 2006; Kraaij et al., 2011). Показана также возможность гормональной регуляции физиологической активности морских беспозвоночных животных (моллюсков, ракообразных) с использованием Dex (Bal et al., 2017). Обнаружение у иглокожих кортикостероидов (Gurst et al., 1973), а также рецепторов к стероидам (Lafond, Mathieu, 2007) позволяет высказать предположение об участии стероидов в регуляции физиологической активности этих животных. Тем не менее, вопрос о гормональной регуляции иммунных процессов у иглокожих остается практически неизученным.

Голотурия *Eupentacta fraudatrix* (Echinodermata, Holothuroidea) – удобный модельный объект для изучения взаимодействия иммунных клеток. Из целомической жидкости голотурии *E. fraudatrix* были получены две фракции фагоцитов (Ф1 и Ф2) и фракция морулярных клеток (МК) (Долматова и др., 2004). Показано, что эти фракции различались по уровню продукции АФК и активности антиоксидантных ферментов (Долматова и др., 2004). Этот вид - обычный обитатель шельфовых вод Мирового океана. Голотурия представляет интерес как источник получения биологически активных веществ и имеет перспективу искусственного разведения (Ковалев и др., 2016). В связи с этим изучение механизмов иммунитета этих животных имеет как фундаментальное, так и практическое значение. Однако взаимодействие иммунных клеток голотурии *E. fraudatrix*, как и других голотурий, оставалось неисследованным.

**Степень разработанности темы.** Исследованию состава и морфологии целоцитов иглокожих, в частности голотурий, посвящено много работ (Елисейкина, Магарламов, 2002; Edean, 1966; Xing et al., 2008; Ramirez-Gomez, Garcia-Ararras, 2010). Однако иммунитет и его механизмы у иглокожих изучены недостаточно. В иммунных клетках беспозвоночных выявлены цитокиноподобные молекулы, стимулирующие фагоцитоз, цитотоксичность, стрессовый ответ, регенерацию и регуляцию клеточной смерти. У моллюсков также описаны рецепторы к ИЛ-2, стимуляция которых индуцирует синтез NO и других АФК (Barcia, Ramos-Martinez, 2008). Многочисленные исследования посвящены важной роли глюкокортикоидных гормонов в механизмах регуляции иммунитета у позвоночных, в частности, индукции апоптоза иммунных клеток. Однако у иглокожих, несмотря на обнаружение стероидных гормонов, роль последних в иммунном ответе не исследована. У некоторых иглокожих, в частности голотурий, установлена роль апоптоза в иммунном ответе и выявлены гены, связанные с развитием апоптоза (Zhao et al., 2019).

**Цель и задачи исследования.** Цель работы заключалась в выявлении возможных механизмов взаимодействия иммунных клеток голотурии *E. fraudatrix* и их модуляции дексаметазоном.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать влияние дексаметазона на уровни апоптоза, ИЛ-1 $\alpha$ -подобных веществ и активность антиоксидантных ферментов в иммунных клетках голотурии *E. fraudatrix*.
2. Выявить редокс- и цитокинзависимые пути развития апоптоза при взаимодействии иммунных клеток голотурии *E. fraudatrix* на гуморальном уровне.
3. Изучить механизмы модулирования дексаметазоном взаимодействия иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix*.

**Научная новизна.** Впервые установлено, что два типа фагоцитов и морулоподобные клетки голотурии *E. fraudatrix* могут взаимодействовать между собой на уровне гуморальных продуктов с передачей про- или антиапоптотических сигналов. Иммуноциты в процессе взаимодействия оказывают взаимостимулирующее или взаимоограничивающее действие, в зависимости от типа клеток и длительности их взаимодействия. Впервые показана возможность модуляции дексаметазоном апоптоза в иммунных клетках голотурии *E. fraudatrix* как *in vitro*, так и *in vivo*. Выявлено, что эффект дексаметазона зависел от его концентрации/дозы и длительности воздействия, а также типа иммуноцитов. Обнаружено, что при взаимодействии клеток на гуморальном уровне обработка дексаметазоном клеток-продуцентов приводила к росту или снижению апоптоза в клетках-мишенях в прямой зависимости от его действия в клетках-продуцентах. Установлено, что эффект дексаметазона был опосредован изменениями в редокс-системе клеток-мишеней, при этом в фагоцитах активация антиоксидантной ферментной системы, прежде всего, каталазы защищала клетки от апоптоза. Выявлено также наличие цитокин-зависимых механизмов действия дексаметазона на фагоциты, что проявлялось в его ингибирующем влиянии на уровень ИЛ-1 $\alpha$ -подобных веществ в этих клетках.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные результаты о характере взаимодействия между иммунными клетками голотурии *E. fraudatrix* и влиянии на него

дексаметазона свидетельствуют о большей сложности иммунного ответа у голотурий, чем считалось ранее, и подтверждают предположение о возможности стероидной регуляции. Эти данные вносят существенный вклад в понимание эволюции иммунной системы и могут быть использованы в разработке лекционных курсов по клеточной биологии и иммунологии. Кроме того, выявленное сходство в механизмах действия дексаметазона на иммунocyты голотурий с таковым у позвоночных, предполагает возможность моделирования иммунного ответа на клетках голотурий при изучении врожденного иммунитета и исследовании новых лекарственных средств. Обнаруженные различия в чувствительности отдельных типов иммунocyтов голотурий к апоптозмодулирующему действию дексаметазона могут быть использованы также при разработке технологий аквакультуры иглокожих для повышения их иммунной защиты.

**Методология и методы диссертационного исследования.** В данной диссертационной работе применены современные биохимические, цитологические и иммунохимические методы исследования. Определение апоптоза осуществлялось методом горизонтального электрофореза ДНК в агарозном геле, окрашиванием клеток красителем Hoechst 33342 и методом проточной цитометрии. Активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионредуктаза, глутатионтрансфераза) определяли спектрофотометрическими методами. Количественное определение интерлейкин-1 $\alpha$ -подобных веществ проводили иммуноферментным методом.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Дексаметазон оказывает апоптозмодулирующее действие на иммунные клетки голотурии *E. fraudatrix* как *in vitro*, так и *in vivo*, и эффект дексаметазона зависит от его концентрации и типа иммунocyтов, что свидетельствует о возможности использования дексаметазона для моделирования гормональной регуляции иммунитета у голотурий.

2. Иммунocyты голотурии *E. fraudatrix* способны взаимодействовать между собой на уровне гуморальных продуктов *in vitro*, оказывая друг на друга апоптозстимулирующее или апоптозингибирующее действие, в зависимости от типа клеток, длительности их взаимодействия и уровня апоптоза как в клетках-мишенях, так и клетках-продуцентах. Апоптозмодулирующее влияние фагоцитов и МК друг на друга обеспечивается различными механизмами в клетках-мишенях: ИЛ-1 $\alpha$ -зависимыми при воздействии фагоцитов на МК и зависящими от уровня антиоксидантной ферментной защиты – при воздействии МК на фагоциты обоих типов, а также Ф2 на Ф1.

3. При гуморальном взаимодействии, про- или антиапоптотическое действие на клетки-мишени напрямую зависит от уровня индуцированного дексаметазоном апоптоза в клетках-продуцентах.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов обеспечена большим объемом материала, использованием современных цитологических, иммунохимических и биохимических методов исследования. О достоверности полученных результатов также свидетельствует воспроизводимость результатов и публикации в рецензируемых журналах. Обсуждение и интерпретация результатов базируется на экспериментальных данных, приведенных в виде рисунков и фотографий. Фактические материалы, представленные в диссертации, полностью соответствуют первичной документации – протоколам исследований.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были доложены на Международной конференции «Aquaculture Europe. Biotechnologies for Quality» (Barcelona, Spain, 2004), Международной научной конференции «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных» (Саранск, 2005), Международной научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов-2» (Борок-Москва, 2007), Конференции молодых ученых ТОИ ДВО РАН «Океанологические исследования» (Владивосток, 2008), Научно-практической конференции неврологов «Нейроиммунология. Рассеянный склероз» (Санкт-Петербург, 2009), VII Всероссийской конференции с международным участием «Иммунологические

чтения в г. Челябинске» (Челябинск, 2012), XVI Всероссийской медико-биологической научной конференции молодых ученых «Фундаментальная и клиническая медицина – Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2013); XVII Всероссийской медико-биологической научной конференции молодых ученых «Фундаментальная и клиническая медицина – Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2014); Третьей научной конференции «Океанография залива Петра Великого и прилегающей части Японского моря» (Владивосток, 2017).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 16 работ, из них 4 статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК РФ.

**Личный вклад автора.** Автор непосредственно участвовал в экспериментальных работах, в анализе и интерпретации полученных результатов, в написании научных публикаций.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка используемых сокращений и списка литературы. Работа изложена на 147 страницах, иллюстрирована 24 рисунками. Список литературы включает 290 наименований, из них 211 на иностранном языке.

**Благодарности.** Выражаю искреннюю благодарность моему научному руководителю к.б.н., ведущему научному сотруднику ТОИ ДВО РАН Л.С. Долматовой за помощь на всех этапах планирования и выполнения работы и анализа полученных результатов. Хочется поблагодарить к.б.н. Т.И. Пономареву за помощь в подготовке работы, ценные замечания и советы при обсуждении, анализе материалов. Выражаю благодарность д.б.н. И.Ю. Долматову, к.б.н. М.Г. Елисейкиной за предоставленных животных для экспериментов и первые методические уроки, д.б.н. Жадану П.М., д.б.н. Дроздову А.Л., д.б.н. В.М. Чудновскому, к.б.н. Ю.Н. Шкрылю и к.б.н. К.В. Рожковану за всестороннюю помощь и внимание. Глубокую признательность выражаю руководству и всему коллективу лабораторий биохимии и гидрохимии ТОИ ДВО РАН за моральную поддержку и внимание.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** Голотурии *E. fraudatrix* были собраны в зал. Петра Великого Японского моря. До начала экспериментов в течение 2-4 недель они находились в аквариуме с проточной аэрируемой морской водой.

**Получение клеточных фракций целомочитов.** Целомическую жидкость отбирали в сосуд с антикоагулирующим раствором (Chia, Xing, 1996) и наносили на ступенчатый градиент фиколла-урографина в соотношении 1:0,4, 1:1 и 1:2 по объему, соответственно (Долматова, Заика, 2007). Центрифугировали при 300 g в течение 15 мин при 5°C. Клетки полученных фракций Ф1, Ф2 и МК отмывали фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБН) (рН 7,4) с добавлением NaCl (36 г/л) и ресуспендировали в среде 199, дополнительно содержащей ионы Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>, глицин, глюкозу, альбумин бычий сывороточный, антибиотик (Одинцова, 2001, в модификации).

Жизнеспособность клеток в полученных фракциях определяли по исключению трипанового синего (Phillips, 1973). Подсчет клеток производили в камере Горяева.

**Изучение влияния дексаметазона на уровни апоптоза, ИЛ-1α-подобных веществ и активность антиоксидантных ферментов иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix*.** Клеточные суспензии (Ф1, Ф2, МК) (1 млн. клеток/мл) инкубировали в течение 18, 24 и 48 ч в круглодонных планшетах при 22°C в отсутствии (контроль) или в присутствии дексаметазона (Dex) в концентрациях 0,1, 1,0 и 100 мкМ.

Для выяснения роли каталазы в развитии дексаметазониндуцированного апоптоза к Ф1 добавляли Dex (100 мкМ) вместе с коммерческим препаратом каталазы (70 мкг/мл) и инкубировали в течение 18, 24 и 48 ч.

Для определения активности антиоксидантных ферментов и концентрации ИЛ-1α-подобных веществ (ИЛ-1α-ПВ) часть суспензии клеток замораживали в жидком азоте и

хранили при  $-18^{\circ}\text{C}$ . Для выделения ДНК суспензию клеток центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин при  $5^{\circ}\text{C}$ , осадок клеток замораживали.

**Исследование взаимодействия иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix* и влияния на него дексаметазона *in vitro*.** На первом этапе эксперимента (преинкубация клеток) получали Ф1, Ф2 и МК (клетки-продуценты) и инкубировали в течение 3 или 24 ч с раствором Dex (100 мкМ) или равным объемом ФСБН (контроль). По окончании инкубации проводили центрифугирование и получали супернатанты Ф1, Ф2 и МК, не обработанных (сФ1, сФ2, сМК) или обработанных дексаметазоном (с(Ф1+Dex), с(Ф2+Dex), с(МК+Dex), соответственно).

На втором этапе полученные супернатанты клеток-продуцентов добавляли к свежесодержанной суспензиям клеток (1 млн кл./1 мл) другого типа (клетки-мишени) в соотношении 1:1 по объему. В контрольные лунки добавляли ФСБН. Инкубацию проводили в течение 30 мин, 18 и 24 ч при температуре  $22^{\circ}\text{C}$ . Для последующего анализа активности антиоксидантных ферментов и концентрации ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ часть суспензии замораживали в жидком азоте. Для последующего определения апоптоза часть клеточной суспензии центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин при  $5^{\circ}\text{C}$ , осадок клеток замораживали, другую часть центрифугировали при 300 g в течение 15 мин при  $5^{\circ}\text{C}$  и осадок фиксировали раствором формалина.

**Оценка влияния дексаметазона на уровень апоптоза фагоцитов *E. fraudatrix in vivo*.** Опытным животным в целомическую полость через прокол стенки тела шприцем вводили Dex (1 или 10 мкг/г). Контрольные животные получали ФСБН. Через 1 ч после инъекции выделяли целомическую жидкость, фракционировали целомоциты и отбирали Ф1. Клетки фиксировали 70% ледяным этанолом для последующих исследований апоптоза методом проточной цитометрии.

**Исследование влияния Ф1, обработанных дексаметазоном *in vivo*, на антиоксидантную ферментативную активность МК при их взаимодействии *in vitro*.** Животные были разделены на группы: I – интактные, II – введение в целомическую полость дексаметазона (10 мкг/г), III – введение ФСБН. Через 1 ч после инъекции отбирали целомическую жидкость и получали отдельные фракции иммуноцитов: в I группе – МК, во II и III группах – Ф1. Осадки клеток ресуспендировали в модифицированной среде 199. Далее Ф1 из II и III групп инкубировали в течение 1 ч при температуре  $22^{\circ}\text{C}$  и получали супернатанты клеток. Супернатанты Ф1, полученные в группе II (с(Ф1+Dex, *in vivo*)) или III (с(Ф1+ФСБН, *in vivo*)) добавляли к суспензиям МК (группа I) в соотношении 1:1 по объему. Инкубацию проводили в течение 24 ч при температуре  $22^{\circ}\text{C}$  и отбирали пробы для определения активности антиоксидантных ферментов.

#### **Определение апоптоза.**

Уровень апоптоза определяли тремя методами:

1. Метод горизонтального электрофореза в агарозном геле (Маниатис и др., 1984). Выделение ДНК из замороженных клеток производили по методу Pramanick et al. (1976) с использованием в качестве депротенизатора 8 M раствор гуанидингидрохлорида.

2. Окрашивание флуоресцентным голубым красителем Hoechst 33342, которое основано на проницаемости клеточных ядер для красителя. При этом краситель Hoechst 33342 окрашивает конденсированный хроматин апоптотических клеток гораздо ярче, чем хроматин живых (Pollack, Ciancio, 1990). Подсчет клеток в окрашенных мазках производили с использованием люминисцентного микроскопа Люмам – Р8 (Россия) и Leica DM4500 P (Германия) при увеличении  $\times 200$ . Апоптотические ядра клеток имели ярко-голубую окраску и сильное свечение, живые – бледно-голубую окраску. Подсчитывали процент апоптотических клеток от общего количества исследованных клеток (не менее 150 клеток) в образце (Pollack, Ciancio, 1990).

3. Метод проточной цитометрии (Хайдуков и др., 2011). Клетки, фиксированные 70% этанолом, отмывали ФСБН и окрашивали йодидом пропидия (10 мкг/мл) при  $37^{\circ}\text{C}$  1 ч в

темноте. Анализ проводили на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA), используя программное обеспечение Cell Fit (Becton Dickinson).

**Измерение активности антиоксидантных ферментов.** Активность ферментов определяли в безъядерных супернатантах клеток. Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1.) определяли по подавлению восстановления нитросинего тетразолия супероксиданионрадикалами, образующимися в реакционной смеси ксантина и ксантиноксидазы (Beauchamp C., Fridovich I., 1971). Активность глутатионредуктазы (ГР, КФ 1.6.4.2) определяли по скорости снижения поглощения НАДФН (Юсупова, 1989). Активность глутатионтрансферазы (ГТ, КФ 2.5.1.18) измеряли по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между глутатионом восстановленным и 1-хлор-2,4-динитробензолом (Habig et al., 1974). Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли по скорости снижения поглощения перекиси водорода (Aebi, 1974). Активность ферментов измеряли на спектрофотометре СФ-56 (Россия). Концентрацию белка определяли окраской Кумасси синим G-250, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (Bradford, 1976).

**Количественное определение ИЛ-1 $\alpha$ -подобных веществ.** Количественную оценку ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ проводили в безъядерных супернатантах клеток иммуноферментным методом с использованием диагностических наборов для определения ИЛ-1 $\alpha$  производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия).

**Статистические методы.** Полученные данные (средние значения  $\pm$  средняя ошибка измерений) анализировали с использованием непарного t теста (программное обеспечение INSTAT-3, GraphPad Software). Разницу между группами считали достоверной при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние дексаметазона на уровни апоптоза, ИЛ-1 $\alpha$ -подобных веществ и активность антиоксидантных ферментов иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix in vitro*.**

Проведенные исследования показали, что через 24 ч инкубации контрольные МК и Ф1 отличались от Ф2 по уровню апоптоза: в Ф2 уровень апоптоза значительно выше, чем в МК и Ф1 (рис. 1, а-в). Окрашивание Hoechst 33342 показало, что доля МК с признаками апоптоза составила  $18,7 \pm 2,2\%$ , Ф1 –  $20,4 \pm 1,2\%$ , а Ф2 –  $30,0 \pm 4,4\%$ .

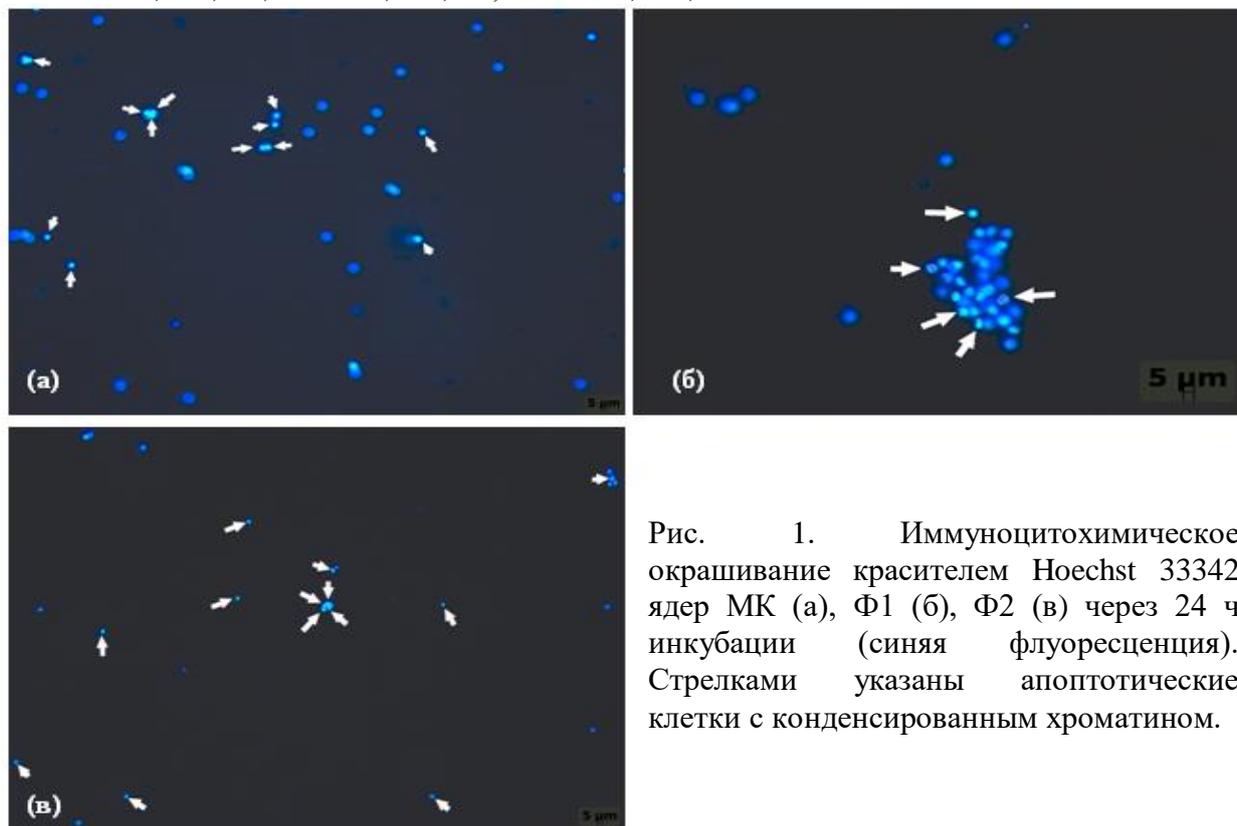


Рис. 1. Иммуноцитохимическое окрашивание красителем Hoechst 33342 ядер МК (а), Ф1 (б), Ф2 (в) через 24 ч инкубации (синяя флуоресценция). Стрелками указаны апоптотические клетки с конденсированным хроматином.

Выявлено, что эффект Дех зависит от концентрации, длительности воздействия и типа иммунных клеток. Так, в МК и Ф1 100 мкМ Дех через 24 ч инкубации стимулировал апоптоз, а концентрации 0,1 и 1 мкМ в МК угнетали его по сравнению с контролем (рис. 2 а, б). В Ф2 низкие концентрации Дех стимулировали, а 100 мкМ - ингибировали апоптоз (рис. 2, в). Через 48 ч инкубации дексаметазон оказывал апоптозстимулирующее действие во всех клетках и при всех исследованных концентрациях (рис. 2, г-е).

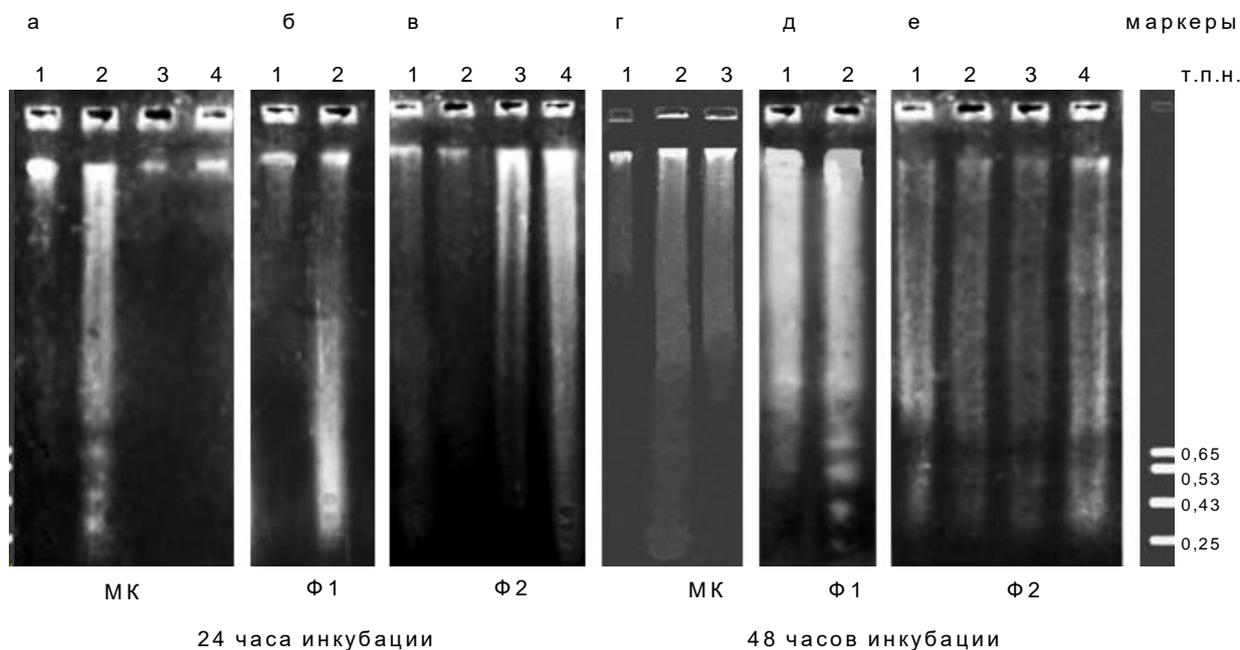


Рис. 2. Фрагментация ДНК в морулярных клетках (МК) (а, г), фагоцитах Ф1 (б, д) и Ф2 (в, е) при воздействии дексаметазона через 24 ч и 48 ч инкубации *in vitro*. Обозначение полос: 1 – контроль; 2 – дексаметазон, 100 мкМ; 3 – дексаметазон, 1 мкМ; 4 – дексаметазон, 0,1 мкМ.

Антиоксидантные ферменты играют существенную роль в обезвреживании АФК, участвующих в механизмах развития глюкокортикоидиндуцированного апоптоза иммунных клеток у позвоночных (Вольский и др., 2001; Артюхов и др., 2011). При 24-часовой инкубации Ф1 голотурий с дексаметазоном происходило концентрационно-зависимое снижение активности СОД и ГР, наиболее значительное снижение отмечено при концентрации 100 мкМ, на 20 и 75 %, соответственно. По-видимому, в Ф1 дексаметазон вызывал выраженный апоптоз, ингибируя антиоксидантную ферментативную систему клеток, как и у позвоночных. Внесение коммерческой каталазы, которая инактивирует перекись водорода, в среду инкубации Ф1, напротив, отменяло апоптотическое действие дексаметазона на фоне нормализации активности СОД и ГР, что указывает на ведущую роль каталазы в защите Ф1 от дексаметазониндуцированного апоптоза, и, соответственно, перекиси водорода в механизме его развития. Полученные результаты соответствуют данным об антиапоптотическом эффекте экзогенной каталазы на нейтрофилы позвоночных (Curi, 1998; Персиянова, 2003), что позволяет предполагать общие антиоксидантные механизмы защиты от апоптоза в фагоцитах позвоночных и голотурий.

Исследование действия дексаметазона на содержание ИЛ-1α-ПВ в Ф2 (наиболее чувствительному к дексаметазониндуцированному апоптозу типу клеток) показало, что Дех через 24 ч инкубации снижал уровень ИЛ-1α-ПВ в обратной зависимости от концентрации. Таким образом, индукция дексаметазоном апоптоза Ф2 происходит на фоне ингибирования им уровня противовоспалительных цитокинов, как это показано и для клеток позвоночных (Гусев, Черешнев, 2012).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что развитие апоптоза в фагоцитах при действии дексаметазона зависело от изменений концентрации ИЛ-1α-ПВ и активности

антиоксидантных ферментов, прежде всего каталазы. Учитывая, что у позвоночных ИЛ-1 и перекись водорода участвуют в передаче апоптозмодулирующих сигналов между клетками (Nguyen, Tidball, 2002; Costantini et al., 2011), в последующих исследованиях именно этим механизмам было уделено внимание.

**Исследование взаимодействия МК и Ф1 и влияние на него дексаметазона.**

Показано, что супернатант МК, преинкубированных 24 ч (сМК24), оказывал на Ф1 антиапоптотическое действие через 30 мин инкубации, причем этот эффект снижался с увеличением времени инкубации до 24 ч (рис. 3, а). Учитывая, что в самих МК через 24 часа инкубации уровень апоптоза низкий (рис. 1), можно заключить, что апоптозмодулирующее действие МК на Ф1 зависит от уровня апоптоза в клетках-продуцентах.

Кроме того, действие сМК зависело от времени их преинкубации: супернатант МК, преинкубированных 3 ч (сМК3), оказывал проапоптотическое действие на Ф1 через 18 ч инкубации (рис. 3, а).

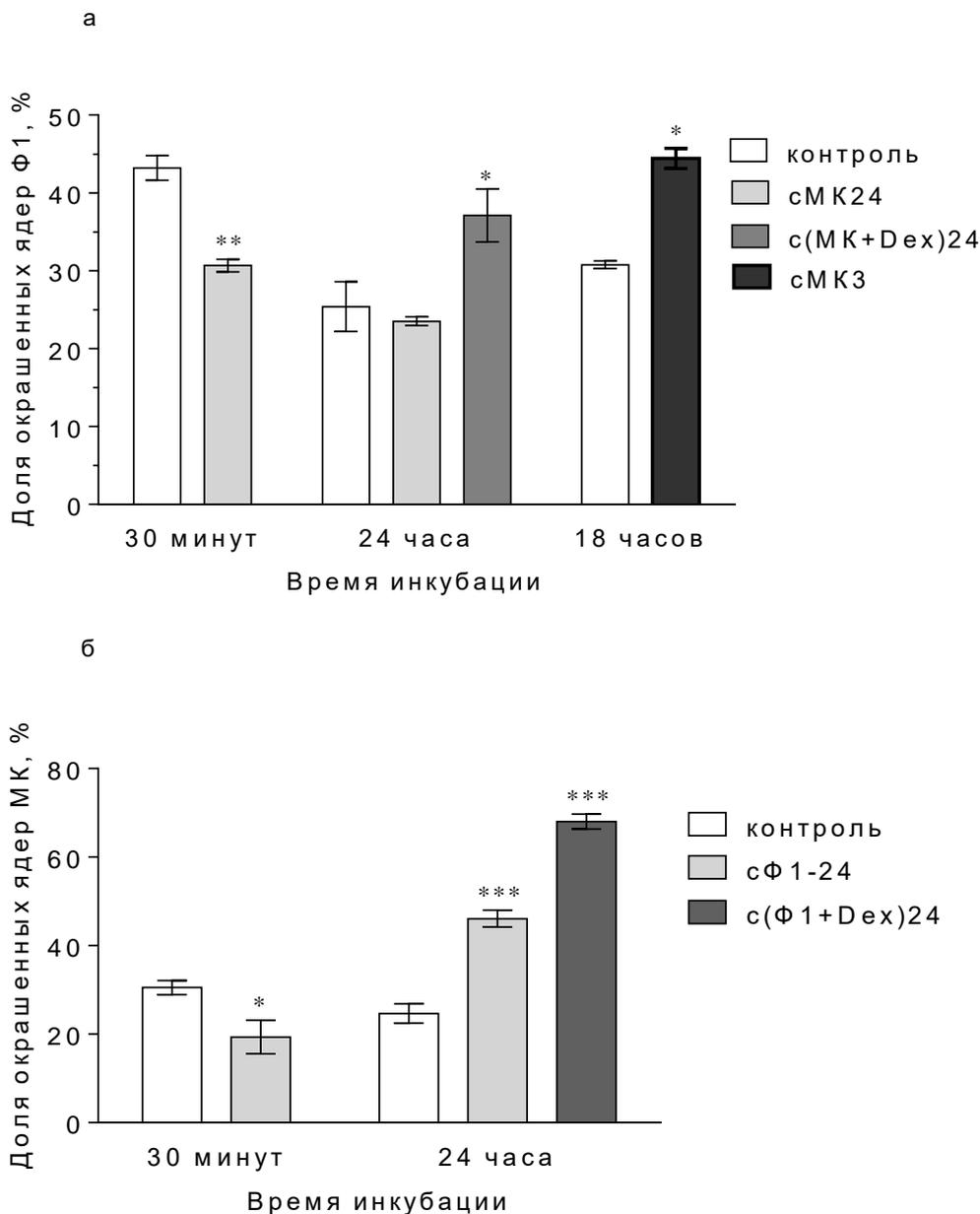


Рис. 3. Доля окрашенных Hoechst 33342 ядер фагоцитов Ф1 при воздействии супернатанта морулярных клеток, преинкубированных 24 ч(сМК24), 3 ч (сМК3) (а) и морулярных клеток (МК) при воздействии супернатанта фагоцитов Ф1, преинкубированных 24 ч (сФ1-24) (б). \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001 по сравнению с контролем.

Добавление к Ф1 супернатантов МК, преинкубированных с дексаметазоном (100 мкМ), при последующей 24-часовой инкубации вызывало выраженный апоптоз (рис. 3, а). Принимая во внимание, что в самих МК дексаметазон стимулировал апоптоз (рис. 2, а), можно предположить, что эффект супернатанта МК на клетки-мишени определяется уровнем апоптоза в клетках-продуцентах.

Таким образом, установлено, что сМК оказывал на Ф1 апоптозстимулирующее или апоптозингибирующее воздействие в зависимости как от времени инкубации с клетками, так и времени преинкубации МК. Механизм снижения антиапоптотического эффекта сМК при увеличении времени инкубации с Ф1 неясен. Известно, что один из ключевых механизмов развития апоптоза при стрессе обусловлен активацией транскрипционного фактора p53 (Blagosklonny, 2002), и связанным с ним ростом продукции АФК (Bragado et al., 2007). Однако существуют данные о том, что p53 может оказывать антиапоптотическое действие по механизму обратной связи (Yang et al., 2012). Представляется вероятным, что на фоне высокого уровня апоптоза в Ф1, наблюдаемым через 30 мин инкубации, гуморальные вещества из МК, также содержащие проапоптотические вещества, «включают», по механизму обратной связи, подобный антиапоптотический механизм, а при относительно низких значениях апоптоза, напротив, происходит снижение антиапоптотического эффекта.

Эффект Ф1 на апоптоз МК также зависел от времени инкубации. Выявлено, что антиапоптотическое действие сФ1-24, обнаруженное через 30 мин инкубации, менялось на проапоптотическое с пролонгированием инкубации с клетками-мишенями до 24 ч (рис. 3, б). Преинкубация Ф1 с дексаметазоном усиливала их проапоптотическое действие на МК (рис. 3, б). Учитывая, что в самих Ф1, обработанных дексаметазоном, как показано выше (рис. 2, б), наблюдался апоптоз, полученные данные являются подтверждением представления о том, что эффект супернатанта зависит от уровня апоптоза в клетках-продуцентах.

Согласно современным представлениям, иммунный ответ у позвоночных включает не только быструю и эффективную активацию, но и адекватное ингибирование, позволяющее снизить неблагоприятное воздействие избыточных продуктов иммунной реакции (Dalpke et al., 2008; Sharoufi-Moghaddam et al., 2018). Однако если для позвоночных описаны механизмы ограничения иммунного ответа, включая взаимодействие клеток на гуморальном уровне, в том числе и иммуномодулирующее действие противовоспалительных цитокинов (Janeway, 2001; Padgett et al., 2013), то для беспозвоночных таких данных практически нет. Учитывая, что изменения уровня апоптоза в клетке характеризуют в определенной мере уровень ее функциональной активности, представленные данные впервые показывают возможность взаиморегулирующего действия Ф1 и МК голотурии *E. fraudatrix*, результат, которого зависит от времени их взаимодействия.

Исследование цитокинзависимых механизмов развития апоптоза при взаимодействии сМК и Ф1 показало, что уровень ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ зависел от времени инкубации: через 30 мин инкубации – увеличивался в 2 раза, а к концу инкубации, напротив, снижался в 2,2 раза по сравнению с контролем. Эти данные позволяют предположить роль ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ как антиапоптотических медиаторов при воздействии МК на Ф1, аналогично таковой для ИЛ-1 $\alpha$  при взаимодействии иммунных клеток позвоночных (McAllister et al., 2012). Значительное снижение уровня ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ в Ф1 под влиянием с(МК+Dex)24 (в 16 раз по сравнению с контролем) на фоне роста апоптоза подтверждает это представление.

Обнаруженное снижение концентрации ИЛ-1  $\alpha$ -ПВ через 30 мин инкубации МК с сФ1-24 при том, что высокий уровень ИЛ-1  $\alpha$ -ПВ зарегистрирован как в самих Ф1 через 24 ч инкубации, так и в контрольных МК через 30 мин, свидетельствуют в пользу участия ИЛ-1  $\alpha$ -ПВ в передаче сигнала от Ф1 к МК, при этом экзогенные ИЛ-1  $\alpha$ -ПВ подавляли синтез эндогенных ИЛ-1  $\alpha$ -ПВ. В свою очередь, снижение ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ могло приводить к уменьшению продукции оксида азота, между уровнями которых у позвоночных имеется прямая связь (Mejía-García et al., 2013). Известно, что оксид азота является одним из важных индукторов апоптоза и снижение его уровня сопровождается уменьшением уровня апоптоза (Madge, Pober, 2000). Подобный механизм, вероятно, может быть задействован и при

воздействии сФ1-24 на МК, на что указывает соответствие колебаний уровня апоптоза, отмеченных выше (снижение через 30 мин и рост через 24 ч инкубации МК с сФ1-24) изменениям уровня ИЛ-1  $\alpha$ -ПВ.

Для выяснения роли оксидантно-антиоксидантного баланса в развитии апоптоза при взаимодействии Ф1 и МК было проведено исследование активности каталазы (рис. 4). При воздействии сМК3 на Ф1 активность каталазы в клетках снижалась в прямой зависимости времени инкубации. Напротив, при взаимодействии сМК24 с Ф1 с увеличением времени инкубации наблюдалось возрастание активности каталазы. Таким образом, ингибирование активности каталазы происходило в период возрастания уровня апоптоза, а ее увеличение, напротив, оказывало защитный антиапоптотический эффект. Изменения активности каталазы в Ф1 во время инкубации с сМК связаны с модулирующим действием гуморальных веществ, продуцируемых МК во время их преинкубации. Таковыми являются, в частности, ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ, увеличение уровня которых было отмечено в Ф1 в первые 30 мин после добавления сМК-24.

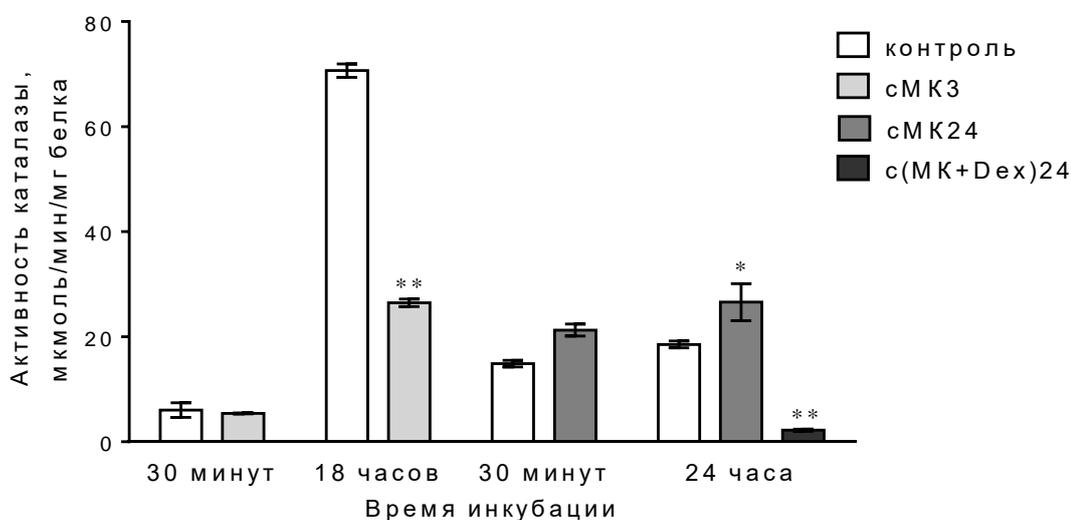


Рис. 4. Изменение активности каталазы в фагоцитах Ф1 при инкубации с супернатантом морулярных клеток (сМК). \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  по сравнению с контролем.

По данным Ballarin et al. (2001), цитокиноподобные вещества, синтезируемые морулярными клетками асцидий (хордовые), стимулируют «респираторный взрыв» в фагоцитах. По-видимому, в основе стимуляции активности каталазы в Ф1 при 30-минутном воздействии сМК24 лежит увеличение уровня АФК по сходному механизму. Зависимость активности каталазы от времени инкубации с максимумом увеличения активности фермента через 24 ч указывает на то, что эти изменения в Ф1 при действии сМК24 осуществлялись через индукцию ядерных факторов (Giavarotti et al., 2013).

Напротив, при воздействии с(МК+Dex)24, вызывавшего, как отмечено выше, развитие апоптоза, происходило снижение активности каталазы в Ф1 (рис. 4). Такой эффект указывает на повышение в клетках уровня перекиси водорода, вероятно, за счет молекул, поступивших в клетку из супернатантов МК, преинкубированных с дексаметазоном. Поскольку в МК при 24 ч инкубации с дексаметазоном (100 мкМ), как показано выше (рис. 2, а), развивается апоптоз, эти данные свидетельствуют о том, что в иммунных клетках голотурий одним из механизмов проапоптотического действия дексаметазона, как и у позвоночных (Nie et al., 2019), является стимуляция продукции перекиси водорода.

При воздействии сФ1-24 на МК снижение уровня апоптоза в МК через 30 минут инкубации сопровождалось снижением активности каталазы и увеличением активности глутатионзависимых ферментов (табл. 1). При этом, по-видимому, решающее значение

оказывали антиапоптотические вещества из Ф1. Увеличение уровня ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ в Ф1 через 24 ч, как это показано выше, позволяет предположить, что этими антиапоптотическими веществами являлись ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ. Так как известно, что ИЛ-1 $\alpha$  воздействуя на клетку-мишень могут вызывать увеличение продукции оксида азота, что приводит к снижению апоптоза (Yim et al., 2013).

Увеличение уровня апоптоза в МК через 24 ч воздействия сФ1 происходило на фоне роста активности каталазы и ГТ (табл. 1) и, по-видимому, уже связано с увеличением продукции АФК в МК, поскольку уровень ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ равен контролю.

Таблица 1. Активность антиоксидантных ферментов в морулярных клетках (МК) при инкубации с супернатантом фагоцитов Ф1.

Активность фермента	контроль		сФ1-24		с(Ф1+Dex)24
	30 мин	24 ч	30 мин	24 ч	24 ч
Каталаза, мкмоль/мин/мг белка	118,8 $\pm$ 13,9	8,6 $\pm$ 1,1	31,9 $\pm$ 6,3**	16,6 $\pm$ 4,8**	51,6 $\pm$ 3,2***
ГР, нмоль/мин/мг белка	15,7 $\pm$ 1,2	194,2 $\pm$ 3,6	142,7 $\pm$ 4,2***	135,4 $\pm$ 2,4***	132,8 $\pm$ 5,5*
ГТ, нмоль/мин/мг белка	5,6 $\pm$ 0,3	1,62 $\pm$ 0,2	7,6 $\pm$ 0,2*	4,5 $\pm$ 0,4*	7,8 $\pm$ 0,3***

Примечание: \* P<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* P<0,001 по сравнению с контролем.

Развитие апоптоза в МК, обработанных с(Ф1+Dex)24, происходило также на фоне увеличения активности каталазы, ГТ и снижении активности ГР (табл. 1). Можно предположить, что в Ф1 образуются проапоптотические продукты, которые и вызывают увеличение уровня апоптоза. Этими продуктами, по-видимому, являются АФК, в частности, перекись водорода.

Таким образом, если в Ф1 апоптоз при воздействии гуморальных продуктов из МК развивался на фоне снижения антиоксидантной ферментной защиты, то в МК, напротив, - на фоне ее увеличения. По-видимому, апоптоз-регулирующие механизмы этих клеток различны, и определяется это различиями в их функциях.

Полученные данные по взаимодействию Ф1 и МК указывают, что в передаче антиапоптотического сигнала к клетке-мишени участвуют ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ, а проапоптотического – перекись водорода. Также данные указывают на возможность взаиморегулирующего действия Ф1 и МК, результат которого зависит от длительности взаимодействия. Это взаимовлияние может регулироваться дексаметазоном, усиливая эффект гуморальных продуктов из клеток-продуцентов на клетки-мишени.

**Влияние дексаметазона на кооперационный ответ МК и Ф2 голотурии *E. fraudatrix*.** Наличие у голотурий двух типов фагоцитов предполагает также возможность взаимодействия Ф2 и МК.

Показано, что сМКЗ стимулировал апоптоз в Ф2 через 18 ч инкубации (рис. 5, а). В соответствии с тем, что в самих МК, в начале инкубации наблюдался апоптоз (рис. 3, б) добавление дексаметазона (100 мкМ) в среду преинкубации МК усиливало апоптозстимулирующий эффект их супернатанта на Ф2 (рис. 5, а).

В свою очередь, гуморальные продукты из Ф2, также как из Ф1, стимулировали апоптоз в МК (рис. 5, б). Таким образом, супернатанты обоих типов фагоцитов действовали на МК однонаправлено.

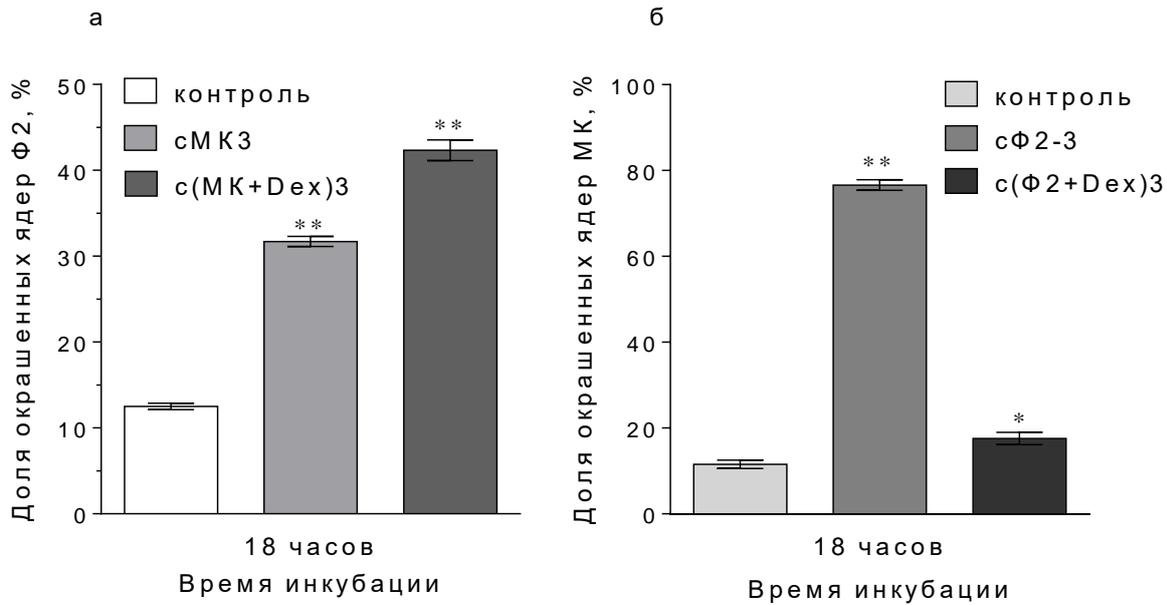


Рис. 5. Доля окрашенных Hoechst 33342 ядер фагоцитов Ф2 (а), проинкубированных 18 ч с супернатантом морулярных клеток (сМК3) и морулярных клеток (МК) (б), проинкубированных 18 ч с супернатантом фагоцитов Ф2 (сФ2-3). \*  $P < 0,01$ ; \*\*  $P < 0,001$  по сравнению с контролем.

Выявлено также, что сМК снижал активность каталазы (рис. 6, а) и активировал СОД (рис. 6, б) в Ф2. Это свидетельствует об увеличении в Ф2 уровня продукции АФК, прежде всего супероксид аниона-радикала, что, по-видимому, лежит в основе развития апоптоза в этих клетках.

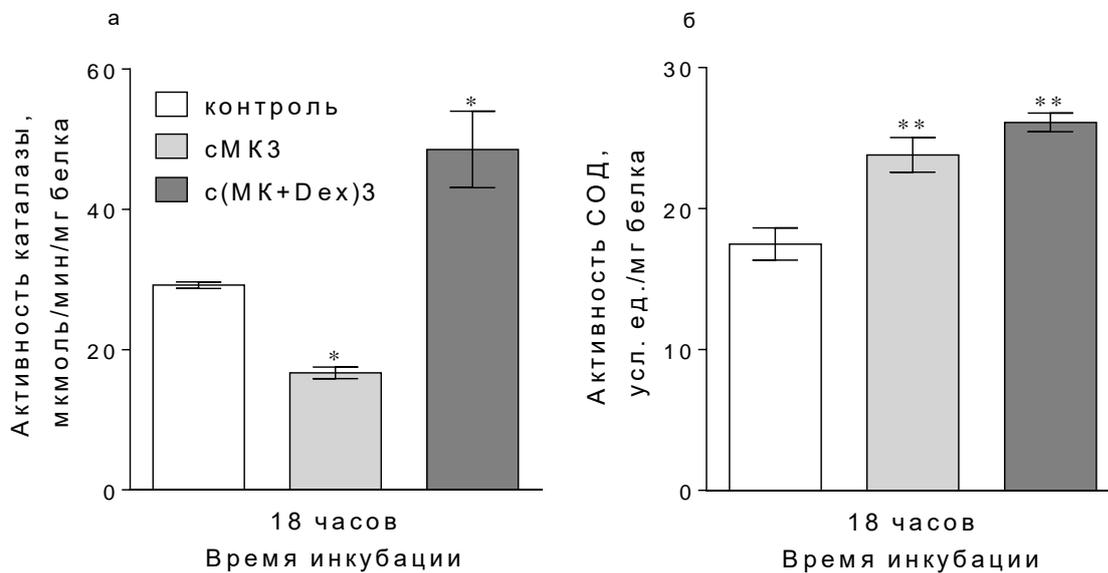


Рис. 6. Изменение активности каталазы (а) и супероксиддисмутазы (СОД) (б) в фагоцитах Ф2 при 18-часовой инкубации с супернатантом морулярных клеток (сМК3). \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,001$  по сравнению с контролем.

При инкубации Ф2 с с(МК+Dex)3 антиоксидантная ферментная защита возрастала (рис. 6), но не защищала клетки от развития апоптоза (рис. 5). Такие изменения активности ферментов, прежде всего, рост активности каталазы, указывают на увеличение уровня перекиси водорода в Ф2, по-видимому, поступившей из МК, и  $\text{H}_2\text{O}_2$ -зависимый механизм

действия дексаметазона на клетки-продуценты. Таким образом, механизмы воздействия на Ф2 гуморальных продуктов из МК, под влиянием дексаметазона, и в его отсутствие различны.

Установлено, что при влиянии сФ2-3 на МК активность исследованных антиоксидантных ферментов снижалась, за исключением СОД (табл. 2), что указывает на увеличение в клетках концентрации перекиси водорода, по-видимому, поступающей из Ф2. Это подтверждает наличие  $H_2O_2$ -индуцируемого механизма развития апоптоза в МК.

Таблица 2. Активность антиоксидантных ферментов в морулярных клетках при 18-часовой инкубации с супернатантом фагоцитов Ф2

Активность фермента	контроль	сФ2-3	с(Ф2+Dex)3
Каталаза, мкмоль/мин/мг белка	37,9±4,1	21,2±2,2	30,6±2,8
СОД, усл. ед./мг белка	31,6±2,2	27,8±3,2*	31,2±4,3**
ГР, нмоль/мин/мг белка	38,6±5,1	21,9±2,3*	13,2±1,1*
ГТ, нмоль/мин/мг белка	7,0±1,4	2,9±0,3*	7,9±1,5

Примечание: \* P<0,05; \*\* P<0,001 по сравнению с контролем.

Инкубация МК с с(Ф2+Dex)3 не сопровождалась изменениями в активности СОД, по сравнению с контролем (табл. 2). Однако происходило увеличение активности каталазы по сравнению с таковой при воздействии сФ2-3, что свидетельствует о прямой зависимости апоптоза от уровня перекиси водорода. Изменения активности глутатионзависимых ферментов (табл. 2) (увеличение активности ГТ до нормального уровня и снижение активности ГР) свидетельствовали также о сохранении пула восстановленного глутатиона в МК. По-видимому, антиоксидантная система защищала МК от развития апоптоза, индуцируемого перекисью водорода из с(Ф2+Dex)3.

Таким образом, механизмы апоптозстимулирующего действия Ф2 и МК друг на друга различны, и наиболее вероятно, что перекись водорода является сигнальной молекулой при воздействии Ф2 на МК. Обработка МК и Ф2 дексаметазоном приводила к различному эффекту их супернатантов на клетки-мишени в соответствии с различной чувствительностью клеток-продуцентов к апоптозмодулирующему эффекту дексаметазона.

#### **Влияние дексаметазона на кооперационный ответ Ф1 и Ф2 голотурии *E. fraudatrix*.**

При исследовании воздействия Ф2 на Ф1 показано, что сФ2 оказывал на Ф1 зависимое от времени апоптозингибирующее действие, причем, с возрастанием времени инкубации с 30 мин до 24 ч эффект сФ2 ослабевал (рис. 7). 24-часовая преинкубация Ф2 с дексаметазоном способствовала значительному снижению апоптоза в Ф1 при их инкубации с с(Ф2+Dex)24 (рис. 7).

Таким образом, гуморальные вещества из Ф2 способны снижать уровень апоптоза в Ф1, и синтез этих веществ увеличивается под воздействием дексаметазона. Принимая во внимание, что через 24 ч инкубации признаки апоптоза обнаружены как в Ф2, так и в Ф1, можно ожидать, что в обоих типах клеток накапливаются одинаковые медиаторы апоптоза, а наблюдаемое снижение апоптоза в Ф1 при 24-часовом воздействии сФ2-24, по-видимому, происходит благодаря механизмам обратной связи. Причем наличие дексаметазона в преинкубационной среде усиливает ингибирующее действие супернатанта Ф2. Полученные данные согласуются с опубликованными сведениями об ингибирующем действии глюкокортикоидов на апоптоз иммунных клеток позвоночных: дексаметазон подавляет апоптоз в нейтрофилах (Полетаева и др., 2009; Zen et al., 2011).

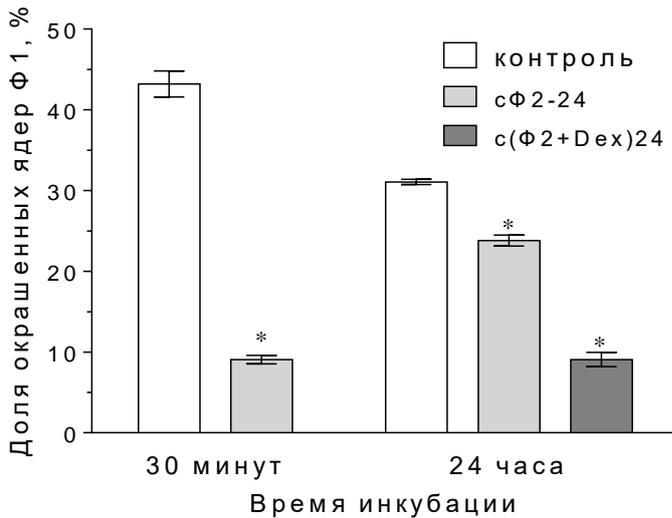


Рис. 7. Доля окрашенных Hoechst 33342 ядер фагоцитов Φ1 при воздействии супернатанта фагоцитов Φ2, преинкубированных 24 ч (сΦ2-24) \* P<0,001 по сравнению с контролем.

Учитывая, что Φ2, как и Φ1, являются продуцентами АФК (Dolmatova et al., 2003), уровень которых возрастает при апоптозе, механизм обратной связи может включать подавление уровня АФК в Φ1 при воздействии сΦ2. Антиапоптотическое действие с(Φ2+Dex)24 на Φ1, учитывая, что дексаметазон снижал апоптоз в преинкубированных Φ2, осуществляется, очевидно, путем прямого действия антиапоптотических продуктов. Вероятно, эту роль играют ИЛ-1α-ПВ, уровень которых высок при действии Dex (100 мкМ) на Φ2 при 24 ч инкубации. Значительное снижение концентрации ИЛ-1α-ПВ в Φ1 – в 3,9 раза по сравнению с контролем при воздействии с(Φ2+Dex)24 может являться следствием ингибирующего действия экзогенных (из Φ2) ИЛ-1α-ПВ и подтверждает высказанное выше предположение о роли ИЛ-1α-ПВ как антиапоптотических гуморальных продуктах.

Для оценки роли оксидантно-антиоксидантного баланса в развитии апоптоза при воздействии Φ2 на Φ1, были исследованы изменения антиоксидантной ферментативной активности в Φ1. При 30-минутной инкубации Φ1 с сΦ2-24 происходило возрастание активности каталазы (рис. 8, а) и ГТ (рис. 8, в) и снижение активности ГР (рис. 8, б). Увеличение времени инкубации до 24 ч сопровождалось, напротив, снижением в Φ1 активности всех исследованных ферментов. Следовательно, активность каталазы и ГТ в течение периода инкубации изменялась противоположным образом. Увеличение активности каталазы через 30 мин инкубации, по-видимому, обусловлено повышением уровня АФК, а ингибирование через 24 ч – истощением активности ферментов к этому времени за счет значительного повышения уровня АФК. В пользу данного предположения свидетельствует и сходный характер изменений активности ГТ, зависящей от уровня восстановленного глутатиона, и, соответственно, от уровня его окисления АФК (Калинина и др., 2014). Учитывая, что ГР обеспечивает восстановление окисленного глутатиона (Pороv et al., 2015), можно утверждать, что отмеченное через 30 мин инкубации увеличение активности каталазы и ГТ, а также снижение активности ГР соответствует достаточно высокому уровню восстановленного глутатиона при сниженном, благодаря активации каталазы, уровне перекиси водорода. Через 24 ч инкубации Φ1 с сΦ2-24 активность всех трех ферментов уменьшалась, что может свидетельствовать о значительном снижении уровня восстановленного глутатиона при длительном поступлении перекиси водорода в клетку.

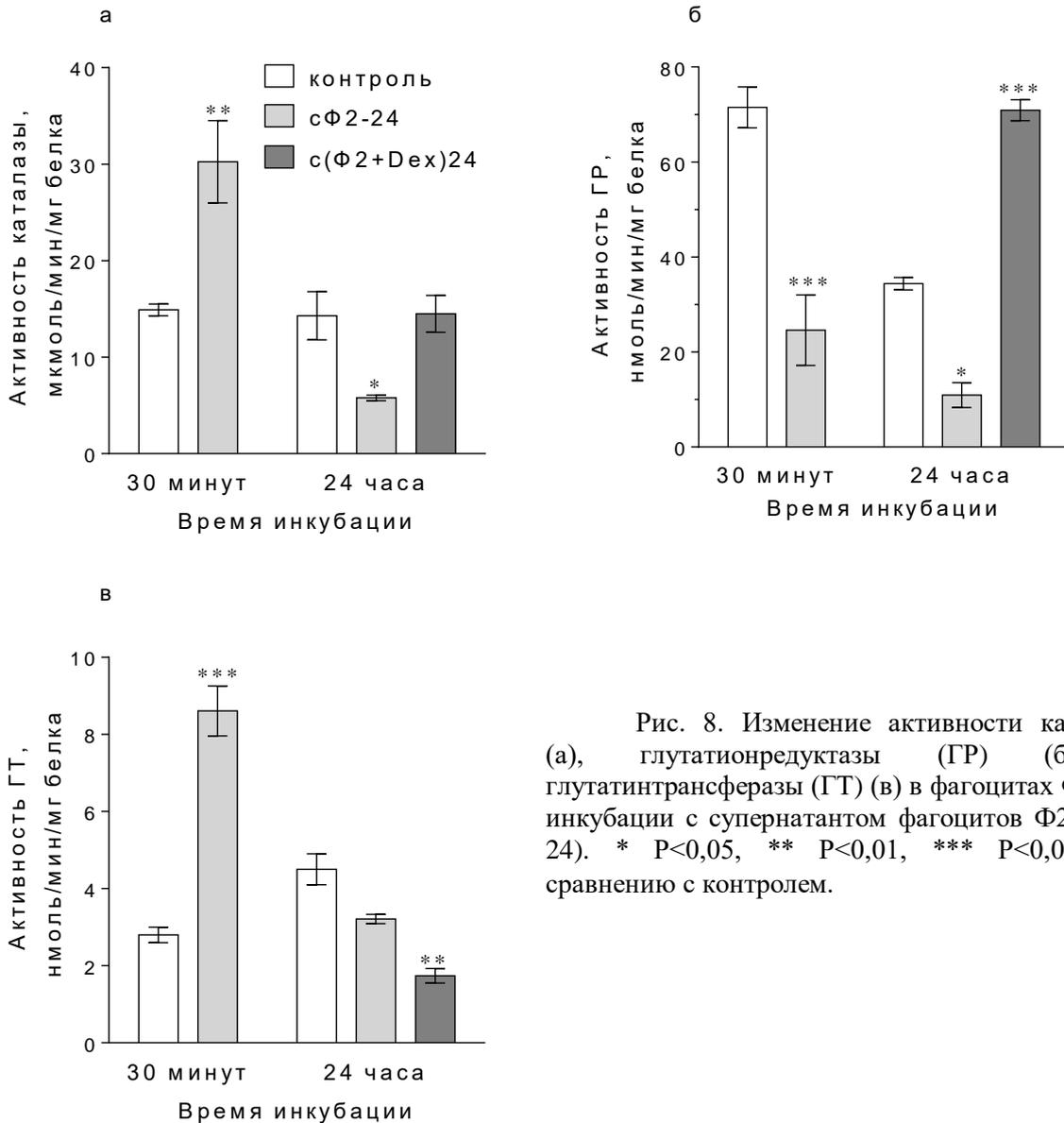


Рис. 8. Изменение активности каталазы (а), глутатионредуктазы (ГР) (б) и глутатинтрансферазы (ГТ) (в) в фагоцитах Φ1 при инкубации с супернатантом фагоцитов Φ2 (сФ2-24). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  по сравнению с контролем.

Сопоставление данных по динамике активности антиоксидантных ферментов с соответствующими изменениями в уровне апоптоза показало, что снижение уровня апоптоза в Φ1 при 30-минутной инкубации с сФ2 происходило на фоне роста активности каталазы и изменения активности глутатион-зависимых ферментов, свидетельствующего о сохранении пула восстановленного глутатиона в клетке. В свою очередь, уменьшение антиапоптотического действия супернатанта Φ2 при увеличении времени инкубации до 24 ч сопровождалось достоверным снижением активности каталазы в Φ1, вероятно, связанным с увеличением поступления перекиси водорода. Динамика активности антиоксидантных ферментов в Φ1 при воздействии супернатанта Φ2 подтверждает предположение о том, что снижение апоптоза в Φ1 обусловлено уменьшением в них уровня АФК, по-видимому, за счет стимуляции активности антиоксидантных ферментов перекисью водорода из Φ2, которая в данном случае выступает в роли сигнальной молекулы, как это описано и для иммунных клеток позвоночных (Costantini et al., 2011).

Обработка с(Φ2+Dex)24 вызывала в Φ1 через 24 ч инкубации значительное увеличение активности каталазы (рис. 8, а) и ГР (рис. 8, б), но ингибировала активность ГТ (рис. 8, в) по сравнению с эффектом сФ2-24. По-видимому, дексаметазон-индуцированное снижение апоптоза в Φ2 (рис. 2, в) приводило к уменьшению в этих клетках АФК, в

частности, перекиси водорода, и к снижению уровня перекиси водорода в Ф1 при их обработке с(Ф2+Dex)24, что предотвращало угнетающий эффект самого супернатанта Ф2 на активность антиоксидантных ферментов в Ф1. Следовательно, действие дексаметазона осуществлялось по АФК-зависимым механизмам, и апоптоз модулирующий эффект зависел от уровня апоптоза в клетках-продуцентах.

Полученные данные о снижении апоптоза в Ф1 при воздействии сФ2 указывают на то, что Ф2 в ранний период взаимодействия, по-видимому, ограничивают функциональную активность Ф1, а при увеличении времени инкубации этот эффект снижается, что, по-видимому, способствует предотвращению повреждения тканей организма при гиперпродукции токсичных веществ, выделяемых активированными клетками. Эти результаты, наряду с различной чувствительностью двух типов фагоцитов к действию дексаметазона, свидетельствуют в пользу представлений о различной роли Ф1 и Ф2 на разных стадиях иммунного ответа. Преинкубация Ф2 с дексаметазоном вызывала значительное снижение апоптоза и при длительной инкубации Ф1 с с(Ф2+Dex)24, таким образом вызывая супрессию ответа Ф1. Таким образом, обработка Dex может усиливать супрессивное действие Ф2 на Ф1.

#### Влияние дексаметазона на апоптоз в Ф1 голотурии *E. fraudatrix in vivo*.

Представляло интерес также выяснение соответствия эффектов дексаметазона *in vitro* его действию *in vivo*. Методом проточной цитометрии установлено, что дексаметазон при введении интактным животным дозозависимым образом повышал уровень апоптоза в Ф1: стимуляция апоптоза происходила только при концентрации дексаметазона 10 мкг/г, а при концентрации 1 мкг/г наблюдалось снижение уровня апоптоза (рис. 9). Эти изменения сопровождалось незначительным снижением или увеличением жизнеспособности фагоцитов по сравнению с контролем при дозах дексаметазона 10 и 1 мкг/г, соответственно.

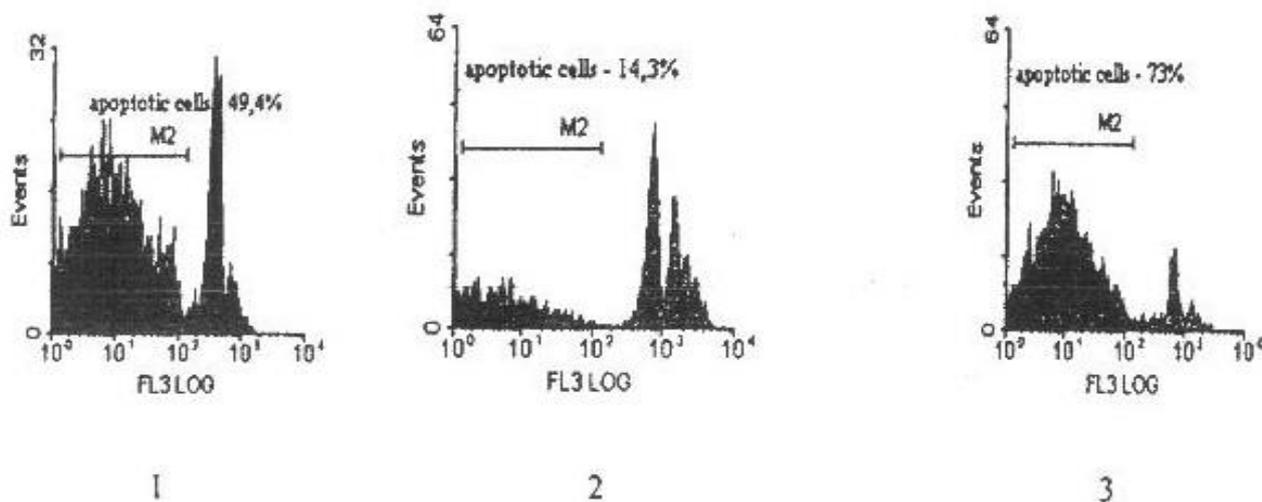


Рис. 9. Влияние дексаметазона на апоптоз фагоцитов Ф1 голотурии *E. fraudatrix in vivo*: 1. фагоциты Ф1, полученные через 1 ч после инъекции животным ФСБН (контроль); 2. фагоциты Ф1, полученные через 1 ч после инъекции животным дексаметазона, 1 мкг/г; 3. фагоциты Ф1, полученные через 1 ч после инъекции животным дексаметазона, 10 мкг/г. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции (логарифмическая шкала), по оси ординат – количество клеток.

Таким образом, дексаметазон в эксперименте *in vivo*, как и *in vitro*, стимулировал апоптоз в Ф1 при возрастании дозы.

**Влияние гуморальных продуктов из Ф1 голотурии *E. fraudatrix*, обработанных дексаметазоном *in vivo*, на антиоксидантную ферментную систему МК *in vitro*.** Показано, что после обработки Ф1 дексаметазоном в апоптозстимулирующей концентрации (10 мкг/г), супернатант Ф1 снижал активность каталазы и ГТ и активировал ГР в МК через 24 ч инкубации (табл. 3).

Таким образом, развитие апоптоза в Ф1 голотурий, которым вводили дексаметазон *in vivo*, сопровождалось появлением гуморальных продуктов, способных снижать уровень антиоксидантной защиты в МК голотурий. Это соответствует данным экспериментов *in vitro* об ингибирующем действии супернатантов, полученных от Ф1 с высоким уровнем апоптоза, на активность антиоксидантных ферментов в МК.

Таблица 3. Активность антиоксидантных ферментов в морулярных клетках при взаимодействии с супернатантом фагоцитов Ф1 полученных после инъекции животным ФСБН или дексаметазона.

Активность фермента	c(Ф1+ФСБН, <i>in vivo</i> )	c(Ф1+Dex, <i>in vivo</i> )
Каталаза, мкмоль/мин/мг белка	73,9,±5,8	54,3±3,5*
ГР, нмоль/мин/мг белка	32,6±2,1	76,7±9,9*
ГТ, нмоль/мин/мг белка	17,3±1,5	6,6±0,9*

Примечание: \* P<0,001 по сравнению с контролем.

В целом, полученные результаты о взаимовлиянии иммунных клеток свидетельствуют о более высокой сложности иммунного ответа голотурий, чем предполагалось ранее, и, учитывая данные о наличии у иглокожих стероидных гормонов (Gurst et al., 1973; Lafont, Mathieu, 2007), возможности его гормональной регуляции. Эти данные вносят вклад в понимание эволюции иммунной системы и могут быть использованы как в разработке лекционных курсов по клеточной биологии и иммунологии, так и при моделировании иммунного ответа при изучении механизмов врожденного иммунитета у позвоночных и исследовании новых лекарственных средств.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые показана способность иммунных клеток голотурии *E. fraudatrix* отвечать на воздействие дексаметазона дозозависимым изменением апоптоза как *in vitro*, так и *in vivo*. Эффект дексаметазона *in vitro* зависит также от времени инкубации и типа иммунных клеток. Дексаметазон в концентрации 100 мкМ оказывает противоположное действие на апоптоз фагоцитов двух типов голотурии *E. fraudatrix*.

2. В апоптозстимулирующих концентрациях дексаметазон снижает активность антиоксидантных ферментов и концентрацию интерлейкин-1 $\alpha$ -подобных веществ в фагоцитах, при этом развитие апоптоза зависит от уровня антиоксидантной ферментной защиты.

3. Выявлено, что при попарном взаимодействии фагоцитов двух типов и морулярных клеток голотурии *E. fraudatrix in vitro* клетки-продуценты оказывают на клетки-мишени апоптозстимулирующее или апоптозингибирующее действие, в зависимости от типа клеток, длительности их взаимодействия и уровня апоптоза в клетках-продуцентах. Предполагается, что такое апоптозмодулирующее влияние клеток друг на друга может лежать в основе взаиморегуляции их функциональной активности при кооперативном иммунном ответе.

4. Апоптозмодулирующее действие клеток-продуцентов на клетки-мишени обеспечиваются различными механизмами: апоптозингибирующее действие осуществляется по интерлейкин-1 $\alpha$ -зависимым путям, а апоптозстимулирующее – по АФК-зависимым путям.

5. Про- или антиапоптотическое действие на клетки-мишени гуморальных продуктов из клеток-продуцентов, обработанных дексаметазоном как *in vitro*, так и *in vivo*, напрямую зависит от индуцированного дексаметазоном уровня апоптоза в клетках-продуцентах. При этом апоптозмодулирующий эффект в клетках-мишенях связан с модуляцией их антиоксидантной ферментной защиты.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК:

1. Долматова Л.С., Уланова О.А., Долматов И.Ю. Сравнительное исследование действия дексаметазона и нового экстракта из голотурий на уровень цитокиноподобных веществ в отдельных типах иммуноцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Тихоокеанский медицинский журнал. 2014. № 1. С. 34–38.
2. Долматова Л.С., Уланова О.А. Изменения антиоксидантной ферментативной активности фагоцитов и морулярных клеток голотурии *Eupentacta fraudatrix* при взаимодействии клеток и их модуляция дексаметазоном // Фундаментальные исследования. 2014. № 5 (2). С. 276–282.
3. Ulanova O.A., Dolmatova L.S. Dexamethasone treatment in vitro resulted in different responses of two fractions of phagocytes of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // Russian Journal of Marine Biology. 2015. V. 41, № 6. P. 503–506.
4. Уланова О.А., Долматова Л.С. Модуляция дексаметазоном взаимодействия двух типов фагоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* (Djakonov et Baranova, 1958) (Holothuroidea: Dendrochirotida) // Биология моря. 2018. Т. 44, № 3. С. 187–193.

### Работы в других изданиях, материалах конференций:

5. Dolmatov I.Yu., Dolmatova L.S., Shitkova O.A., Kovaleva A.L. Dexamethasone-induced apoptosis in phagocytes of holothurian *Eupentacta fraudatrix* // Proceedings of the 11<sup>th</sup> International Echinoderm Conference, Munich, Germany. 2003. – London: CRC Press, 2004. P. 105–119.
6. Dolmatova L.S., Shitkova O.A. Holothurian phagocytes as a model for immune studies: dexamethasone induced apoptosis // Biotechnologies for Quality. Extended abstracts and short communications presented at the International conference “Aquaculture Europe 2004”, Barcelona, Spain, October 20–23, 2004. – European Aquaculture Society Special Publication No. 34. August 2004. P. 302–303.
7. Zaika O.A., Dolmatova L.S. Cooperative apoptosis of coelomocytes of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* and its modulation by dexamethasone // Advances in Bioscience and Biotechnology. 2013. Vol. 4. P. 908–917.
8. Долматова Л. С., Заика О. А. Влияние дексаметазона на кооперацию иммуноцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Нейроиммунология. 2009. Т. 7, № 1. С. 31–32.
9. Долматова Л. С., Заика О. А. Исследование гормональной регуляции уровня ИЛ-1-подобных веществ при взаимодействии клеток отдельных фракций целомоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* in vitro // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 6, № 3. С. 72–74.
10. Долматова Л.С., Заика О.А. Сравнительное исследование действия экстракта из голотурий и дексаметазона на уровень ИЛ-1 $\alpha$ -подобных белков в целомоцитах голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Российский иммунологический журнал. 2013. Т. 7 (16), № 2–3. С. 166.
11. Долматова Л.С., Шиткова О.А., Сапожников А. М. Дексаметазон-индуцированный апоптоз целомоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Материалы Международной научной конференции «Актуальные проблемы экологической физиологии, биохимии и генетики животных», г. Саранск, март 2005 г. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2005. С. 52–56.
12. Долматова Л.С., Добряков Ю.И., Заика О.А. Гуморальная регуляция функциональной активности морулоподобных клеток голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Материалы Международной научно-практической конференции «Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов», г. Борок, 17–20 июля 2007 г. – М.: Россельхозакадемия, 2007. С. 14–18.
13. Заика О.А., Долматова Л.С. Кооперация отдельных субпопуляций целомоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* при воздействии дексаметазона // Океанологические

исследования: Тез. докл. Конференции молодых ученых ТОИ ДВО РАН. – Владивосток: ТОИ ДВО РАН, 2008. С. 82–83.

14. **Заика О. А.** Исследование механизмов регуляции дексаметазоном взаимодействия двух типов фагоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix in vitro* // Тез. XVI Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (с международным участием) «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье», Санкт-Петербург, 20 апреля 2013 г. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2013. С. 160–161.

15. **Уланова О.А.** Регуляция дексаметазоном взаимодействия морулоподобных клеток и фагоцитов II типа голотурии *Eupentacta fraudatrix in vitro* // Тез. XVII Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей (с международным участием) «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье», Санкт-Петербург, 19 апреля 2014 г. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2014. С. 458–459.

16. **Уланова О.А., Долматова Л.С.** Влияние дексаметазона на оксидантно-антиоксидантный баланс в двух типах фагоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Океанография залива Петра Великого и прилегающей части Японского моря: тезисы докладов Третьей научной конференции, 26–28 апреля 2017 г., Владивосток. – Владивосток: ТОИ ДВО РАН, 2017. С. 40–41.

**УЛАНОВА ОЛЬГА АНАТОЛЬЕВНА**

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИММУННЫХ КЛЕТОК ГОЛОТУРИИ *EUPENTASTA*  
*FRAUDATRIX* И ЕГО МОДУЛЯЦИЯ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук