

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

УЛАНОВА ОЛЬГА АНАТОЛЬЕВНА

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Долматова Людмила Степановна

Владивосток – 2019

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Иммуитет позвоночных. Основные звенья иммунного ответа	13
1.2. Иммуитет иглокожих	15
1.3. Апоптоз в клетках иммунной системы	21
1.4. Антиоксидантная ферментативная система и ее участие в апоптозе иммунокомпетентных клеток.....	27
1.5. Взаимодействие иммунных клеток.....	34
1.6. Гормональная регуляция функциональной активности иммунокомпетентных клеток.....	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1. Проведение экспериментов	48
2.1.1. Влияние дексаметазона на уровни апоптоза, ИЛ-1 α -подобных веществ и активность антиоксидантных ферментов иммуноцитов голотурии <i>E. fraudatrix</i>	48
2.1.2. Исследование взаимодействия иммуноцитов голотурии <i>E. fraudatrix</i> и влияния на него дексаметазона <i>in vitro</i>	49
2.1.3. Влияние дексаметазона на уровень апоптоза фагоцитов голотурии <i>E. fraudatrix in vivo</i>	51
2.1.4. Влияние дексаметазона, введенного <i>in vivo</i> , на взаимодействие иммуноцитов голотурии <i>E. fraudatrix</i>	51
2.2. Определение уровня апоптоза.....	51
2.2.1. Определение уровня апоптоза методом горизонтального электрофореза ДНК в агарозном геле	51
2.2.2. Определение апоптоза с помощью окрашивания клеток Hoechst 33342	52
2.2.3. Определение апоптоза с помощью метода проточной цитометрии	53
2.3. Измерение активности антиоксидантных ферментов	53
2.4. Определение концентрации белка	55
2.5. Количественное определение ИЛ-1 α -подобных веществ	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	57

3.1. Влияние дексаметазона на уровни апоптоза, ИЛ-1 α -подобных веществ и активность антиоксидантных ферментов иммунных клеток голотурии <i>E. fraudatrix in vitro</i>	57
3.2. Влияние дексаметазона на кооперационный ответ иммуноцитов голотурии <i>E. fraudatrix in vitro</i>	69
3.2.1. Исследование взаимодействия МК и Ф1 голотурии <i>E. fraudatrix</i> и влияние на него дексаметазона.....	69
3.2.2. Влияние дексаметазона на кооперационный клеточный ответ МК и Ф2 голотурии <i>E. fraudatrix</i>	91
3.2.3. Влияние дексаметазона на кооперационный клеточный ответ Ф1 и Ф2 голотурии <i>E. fraudatrix</i>	102
3.3. Влияние дексаметазона на апоптоз в Ф1 голотурии <i>E. fraudatrix in vivo</i>	108
3.4. Влияние дексаметазона, введенного <i>in vivo</i> , на кооперационный клеточный ответ иммуноцитов голотурии <i>E. fraudatrix</i>	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	121

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ИЛ – интерлейкин

ИЛ-1 α -ПВ – интерлейкин-1 α - подобные вещества

ФНО- α – фактор некроза опухоли α

ЛПС – липополисахарид

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

AP-1 – активаторный белок транскрипции

NF- κ B – ядерный фактор каппа В

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СОД – супероксиддисмутаза

ГР – глутатионредуктаза

ГТ – глутатионтрансфераза

Dex – дексаметазон

БСА – альбумин бычий сывороточный

ФСБН – фосфатно-солевой буферный раствор с добавлением NaCl

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидов

МК – морулярные клетки

Ф1 – фагоциты I типа

Ф2 – фагоциты II типа

сМК24 – супернатант морулярных клеток, преинкубированных 24 ч

с(МК+Dex)24 – супернатант морулярных клеток, преинкубированных 24 ч с дексаметазоном

сМК3 – супернатант морулярных клеток, преинкубированных 3 ч

с(МК+Dex)3 – супернатант морулярных клеток, преинкубированных 3 ч с дексаметазоном

сФ1-24 – супернатант фагоцитов Ф1, преинкубированных 24 ч

с(Ф1+Dex)24 – супернатант фагоцитов Ф1, преинкубированных 24 ч с дексаметазоном

сФ2-3 – супернатант фагоцитов Ф2, преинкубированных 3 ч

с(Ф2+Dex)3 – супернатант фагоцитов Ф2, преинкубированных 3 ч с дексаметазоном

сФ2-24 – супернатант фагоцитов Ф2, преинкубированных 24 ч

c(Φ2+Dex)24 – супернатант фагоцитов Φ2, преинкубированных 24 ч с дексаметазоном

c(Φ1+ΦСБН, *in vivo*) – супернатант фагоцитов Φ1, полученных через 1 ч после введения животным ΦСБН

c(Φ1+Dex, *in vivo*) – супернатант фагоцитов Φ1, полученных через 1 ч после введения животным дексаметазона

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Взаимодействие клеток в процессе функционирования иммунной системы определяет выраженность и точность иммунного ответа. Кооперации иммуноцитов позвоночных посвящены многочисленные исследования (Ярилин, 1999; Шарова и др., 2000; Sharougi-Moghaddam et al., 2018). У позвоночных выделяют контактное взаимодействие клеток и гуморальное. 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). В связи с этим, АФК рассматриваются в настоящее время как важные физиологические молекулы, участвующие во внутри- и межклеточной передаче сигнала (Ткачук и др., 2012). АФК также запускают программируемую клеточную смерть (апоптоз). В фагоцитах позвоночных высокий уровень АФК в процессе иммунного ответа строго контролируется высокой активностью антиоксидантных ферментов. К основным антиоксидантным ферментам относят супероксиддисмутазу (СОД, КФ 1.15.1.1.) и каталазу (КФ 1.11.1.6). СОД обеспечивает превращение супероксидного анион-радикала в менее активный окислитель – перекись водорода и воду, а каталаза обезвреживает образовавшуюся перекись водорода. Важную роль в поддержании в клетке пула восстановленного глутатиона, который является важным неферментативным антиоксидантом, играет глутатионредуктаза (ГР, КФ 1.6.4.2). В свою очередь, глутатионтрансферазы (ГТ, КФ 2.5.1.18) осуществляют обезвреживание организма от ксенобиотиков и собственных токсичных метаболитов, в том числе продуктов перекисидации липидов (Подколзин и др., 2000; Wang et al., 2017).

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 – целоמוциты, 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. Кроме того, эти фракции отличаются по уровню спонтанного апоптоза и активности антиоксидантных ферментов (Долматова и др., 2001; 2004). 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 α , -2, -6, фактором некроза опухолей (ФНО)- α (Legas et al., 1996; Beschin et al., 2001; 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 (Цыган, 2004; Bloom et al., 2004; Zen et al., 2011), выявили важную роль глюкокортикоидных гормонов которые, в частности, являются физиологическими индукторами апоптоза в организме (Volsky et al., 2001; Herold et al., 2006; Полетаева и др., 2009; Singh, Haldar, 2016). Большое количество экспериментов по изучению влияния глюкокортикоидов на иммунные клетки позвоночных животных проведено с использованием синтетического стероида (кортикостероид) дексаметазона (Dex). Показано, что дексаметазон модулирует синтез цитокинов, индукцию апоптоза иммунных клеток, увеличивая в них продукцию активных форм кислорода (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 (Val 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.

Объектом исследования явилась голотурия *Eupentacta fraudatrix* (Echinodermata, Holothuroidea) – обычный обитатель шельфовых вод Мирового океана. Она 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. 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 как по уровню продукции АФК, так и активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза и каталазы) (Долматова и др., 2004). 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; Eudean, 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 α -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 α -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 иммуноциты 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 иммуноцитов 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 (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионредуктазы, глутатионтрансферазы) определяли спектрофотометрическими методами. Количественное определение интерлейкин-1 α -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 иммуноцитов, что свидетельствует о возможности использования дексаметазона для моделирования гормональной регуляции иммунитета у голотурий.

2. Иммуноциты 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 α -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 особо поблагодарить к.б.н. Т.И. Пономареву за неоценимую 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. 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 постоянную моральную поддержку и внимание.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Иммуниет позвоночных. Основные звенья иммунного ответа

Известно, что иммунитет – это комплекс реакций, направленных на поддержание гомеостаза при встрече организма с агентами, которые расцениваются как чужеродные, независимо от того, образуются ли они в самом организме или поступают в него извне (Физиология человека..., 1997). Иммунные реакции включают распознавание «чужого», его удаление и запоминание (Кудрявцев, Полевщиков, 2004). Наиболее изученными являются иммунитет человека и позвоночных животных.

У позвоночных существует два типа иммунитета: естественный (врожденный) и адаптивный (приобретенный) иммунитет. Эти два типа иммунитета реализуют свои функции с использованием различных механизмов. Естественный иммунитет осуществляется путем воспаления, фагоцитоза и выделения фагоцитарными клетками бактерицидных веществ, и не обладает специфичностью. Система адаптивного иммунитета, напротив, обеспечивает строго специфичный ответ, осуществляющийся лимфоцитами, а также путем синтеза антител (Абелев, 1998; Kasamatsu, 2013). Хотя адаптивный иммунитет более эффективен в борьбе с инфекциями, для развертывания полноценного высокоспецифичного иммунного ответа необходимо довольно длительное время. Поэтому в борьбу с инфекцией сначала включается система естественного иммунитета, которая подавляет развитие инфекции до реализации адаптивного ответа, а затем использует свои механизмы (например, фагоцитоз) для элиминации чужеродных антигенов (органических веществ, способных реагировать с рецепторами лимфоцитов иммунной системы и стимулировать иммунный ответ организма). Таким образом, системы естественного и адаптивного иммунитета тесно взаимосвязаны и дополняют друг друга (Фонталин, 1998; Давтян и др., 2005; Riera-Romo et al. 2016).

В иммунном ответе принимают участие иммунокомпетентные клетки, которые могут быть разделены на антигенпрезентирующие (представляющие антиген), регуляторные (регулирующие течение иммунных реакций) и эффекторы иммунного ответа (осуществляющие заключительный этап в борьбе с антигеном). К антигенпрезентирующим клеткам относятся моноциты и макрофаги, эндотелиальные клетки, пигментные клетки кожи и др. К регуляторным клеткам относятся Т-хелперы, Т-супрессоры, Т-лимфоциты памяти. К эффекторам иммунного ответа принадлежат Т-

киллеры (цитотоксические Т-лимфоциты) и В-лимфоциты, являющиеся, в основном, антителопродуцентами (Физиология человека..., 1997). Иммунный ответ начинается с взаимодействия антигенпрезентирующих клеток с антигеном, после чего происходит его фагоцитоз и переработка до продуктов деградации, которые выделяются наружу антигенпрезентирующей клетки.

Важную роль в иммунном ответе играют цитокины – группа белков, участвующих в сигнализации между клетками во время иммунного ответа. Они участвуют в регуляции иммунных и воспалительных реакций, а также в процессах дифференцировки и пролиферации различных типов клеток, взаимодействуя со специфическим рецептором, расположенным на поверхности клеток. К наиболее изученным цитокинам относятся ИЛ-1, ИЛ-2 и ФНО- α (Фрейдлин, 1996; Кадагидзе, 2003; Turner et al., 2014).

Фагоциты и фагоцитоз. Фагоциты — клетки иммунной системы, которые защищают организм путём поглощения (фагоцитоз) вредных чужеродных частиц, бактерий, а также мёртвых или погибающих клеток (Тотолян, Фрейдлин, 2000). Они важны для борьбы с инфекцией и постинфекционного иммунитета. Фагоцитоз обнаружен у всех представителей животного мира. В настоящее время у многоклеточных организмов показана роль фагоцитоза не только в защитных реакциях врожденного и приобретенного иммунитета, но и в процессах развития и морфогенеза организма, поддержания постоянства клеточного состава всех тканей путем элиминации погибающих (апоптотических) клеток (Кудрявцев и др., 2012).

Фагоциты человека и других животных называют «профессиональными» или «непрофессиональными» в зависимости от того, насколько эффективно они фагоцитируют. К профессиональным фагоцитам относятся нейтрофилы, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и тучные клетки. К «непрофессиональным» - эпителиальные, эндотелиальные, паренхиматозные клетки и фибробласты. Основное отличие «профессиональных» фагоцитов от «непрофессиональных» в том, что первые имеют на своей поверхности молекулы, называемые рецепторами, которые обнаруживают чужеродные объекты, например, бактерии (Ernst, Stendahl, 2006).

По современным данным литературы, выделяют два полярных фенотипа активированных макрофагов, обозначаемых как фенотипы M1 и M2. Макрофаги фенотипа M1 характеризуются активной выработкой провоспалительных цитокинов,

значительного количества NO и цитотоксических молекул. Для макрофагов фенотипа M2 характерен высокий синтез противовоспалительных цитокинов и фагоцитарная активность (Монастырская и др., 2008). При этом классически активированные макрофаги инициируют воспаление и защиту хозяина от инфекций, а макрофаги M2 участвуют в регенерации тканей и удалении паразитов (Fraternale et al., 2015).

В процессе фагоцитоза увеличивается потребление кислорода – происходит так называемый «респираторный взрыв». При этом образуются АФК, наибольшее значение из которых имеют перекись водорода и ее производные, которые обладают противомикробным действием. Этот киллерный механизм наиболее изучен у макрофагов и нейтрофилов, хотя имеет место и у других популяций лейкоцитов. Его сущность заключается в том, что после контакта с мишенью и активации соответствующих рецепторов на мембранах фагоцита начинаются процессы выработки АФК. Прежде всего, образуется нестабильный промежуточный продукт – супероксиданион-радикал. В дальнейшем из него образуется перекись водорода, которая и оказывает токсическое действие на микроорганизмы (Shatwell, Segal, 1996; Rejendran et al. 2014). Супероксиданион также взаимодействует с пероксидом водорода с образованием гидроксильной группы, которая помогает в уничтожении патогенных микробов (Delves et al., 2006; Ткачук и др., 2012). Фагоциты движутся в организме, взаимодействуя с фагоцитарными и нефагоцитарными клетками иммунной системы. Они обмениваются информацией с другими клетками с помощью образования цитокинов, которые вызывают другие фагоциты к области инфекции или активируют «спящие» лимфоциты (Phagocytes... 1997).

1.2. Иммунитет иглокожих

Тип Иглокожие (Echinodermata) – вторичноротые животные, полость тела (целом) которых заполнена целомической жидкостью с находящимися в ней отдельными клетками целомоцитами. Современные иглокожие разделяются на 5 классов: морские лилии (Grinoidea), голотурии (Holothurioidea), морские ежи (Echinoidea), морские звезды (Asteroidea) и змеехвостки, или офиуры (Ophiuroidea) (Елисейкина, Магарламов, 2002).

Иглокожие, представляют группу организмов, находящуюся в основании древа Deuterostomia, к которому относятся и позвоночные, и иммунная система иглокожих представляет собой достаточно сложно организованную морфофункциональную структуру.

Голотурии представляют значительный интерес как в качестве пищевых объектов, так и источников получения биологически активных веществ (Беседнова, 2014). Многие виды являются объектами аквакультуры или имеют перспективу искусственного разведения (Ковалев и др., 2016). В то же время, находясь в контакте с другими организмами, например болезнетворными бактериями, морские гидробионты подвержены риску заболеваний и гибели (Долматова и др., 2017). В связи с необходимостью контроля за состоянием популяций важно изучать иммунитет этих животных и возможности его регуляции.

Иммунитету иглокожих (Echinodermata) до последнего времени уделялось не столь значительное внимание, как иммунитету позвоночных животных. Врожденный иммунитет иглокожих является высокочувствительным и обеспечивает резистентность животных к внешним повреждающим агентам (Кудрявцев и др., 2005). Иммунная система иглокожих включает ряд компонентов, аналогичных млекопитающим. Так, клетки иглокожих синтезируют цитокиноподобные молекулы, схожие с ИЛ-1, -2, -6, ФНО- α , а также их рецепторы (Beck, 1998; Santiago et al., 2000). Участие этих молекул в иммунном ответе показано в ряде работ (Legas et al., 1996; Beschin et al., 2001; Кудрявцев, Полевщиков, 2004). Так, целомоциты морской звезды *Asterias rubens* в ответ на стимуляцию липополисахаридами (ЛПС) продуцировали две изоформы ИЛ-1-подобной молекулы, которые, при внесении в культуру целомоцитов, вызывали возрастание их пролиферативной активности (Кудрявцев, Полевщиков, 2004).

Иммунные клетки иглокожих. Иммунный ответ у иглокожих осуществляется целомоцитами, свободноциркулирующими клетками, присутствующими не только в целомической жидкости, но и в тканях различных органов, и выполняющие множество функций в организме (Елисейкина, Магарламов, 2002).

Целомоциты иглокожих представляют гетерогенную клеточную популяцию, включающую несколько типов и разновидностей клеток (Byrne, 1986; Canicatti et al., 1989), причем попытки классифицировать (на основе морфологических признаков) клеточные элементы иглокожих предпринимались многими авторами (Lecal, 1980; Messer, Wardlaw, 1980; Edds, 1993).

К настоящему времени выделено шесть типов целомоцитов, наличие которых в настоящее время признается большинством авторов (Smith, 1981; Smiley, 1994; Chia, Xing, 1996; Елисейкина, Магарламов, 2002; Liu et al., 2005). К этим типам относятся:

фагоциты (фагоцитирующие амебоциты), морулярные или сферулярные, клетки, жгутиковые клетки, кристаллические клетки, ювенильные (лимфоцитоподобные) клетки и гемоциты. Четыре из перечисленных типов целомоцитов являются функциональными аналогами клеток крови позвоночных: фагоциты - аналогичны макрофагам; морулярные клетки – тучным клеткам; ювенильные – лимфоцитам, а гемоциты - эритроцитам низших позвоночных (Fontaine, Lambert, 1973; Chia, Xing, 1996). Наиболее обычными и общими для всех классов иглокожих являются фагоциты и морулоподобные клетки (Кудрявцев, Полевщиков, 2004).

Фагоциты, подобно макрофагам позвоночных, осуществляют фагоцитоз и инкапсулирование чужеродного материала (Исаева, Коренбаум, 1989; Chia, Xing, 1996). Это активно-подвижные клетки с непостоянной формой тела, округлым ядром, включающим 1-2 ядрышка, и в разной степени развитым гранулярным аппаратом, в зависимости от чего могут условно подразделяться на агранулярные и гранулярные. Первые характеризуются сравнительно меньшими размерами и более высоким ядерно-плазменным отношением, цитоплазма содержит несколько вакуолей и гранул. Вторые – несколько крупнее, ядро может быть не совсем правильной формы, цитоплазма заполнена многочисленными гранулами (Коренбаум, Воробьев, 1988; Исаева, Коренбаум, 1989). Для амебоцитов описаны два основных состояния: петалоидное и филоподиальное. Петалоидные фагоциты – округлой формы, с широкими псевдоподиями, которые включают крупную вакуоль. Полагают, что петалоидные амебоциты ответственны за фагоцитоз чужеродных частиц (Smith, 1981). Появление филоподиальных амебоцитов в условиях *in vivo* связано с повреждением тканей и нарушением целостности целомической жидкости. Трансформация происходит быстро, является обратимой и сопровождается перестройкой актин-миозинового цитоскелета. Петалоидные и филоподиальные амебоциты характеризуются разными адгезионными свойствами. Филоподиальные амебоциты более склонны к активной агрегации, что при нарушении гомеостаза способствует его восстановлению и изоляции патогенов путем формирования клеточного сгустка.

Внутри популяции петалоидных фагоцитов выделяют несколько субпопуляций в зависимости от особенностей организации актинового цитоскелета, и, следовательно, формы распластывания на субстрате, а также от размера клетки: дискоидальные, полигональные (Edds, 1993) и малые фагоциты (Gross et al., 2000). Функциональные и

цитологические особенности последних исследованы довольно мало. Во взвешенном состоянии дискоидальные и полигональные фагоциты морфологически неразличимы, однако, легко разделяются в градиенте сахарозы: форма тела первых описывается более или менее правильной окружностью, вторых – ломаной линией. И те, и другие способны трансформироваться в филоподиальную стадию при изменении внешних условий (Edds, 1984). Дискоидальные клетки всегда доминируют по численности, они образуют равномерный монослой, в отличие от них, полигональные фагоциты склонны к объединению в небольшие агрегаты, легко диссоциируемые изменением осмотичности раствора (Edds, 1993). Имеются некоторые различия между дискоидальными и полигональными фагоцитами в наборе выполняемых ими функций. Клетки первой из названных субпопуляций вовлечены в инкапсуляцию (Clow et al., 2004), способны к фагоцитозу и хемотаксису (Gross et al., 2000). Полигональные клетки также проявляют фагоцитарную и хемотаксическую активности (Gross et al., 2000; Clow et al., 2004), участвуют в реакциях инкапсуляции и свертывания, кроме того, они способны к секреции лизоцима, что может служить дополнительной антимикробной защитой организма.

Другая субпопуляция целомоцитов – это гранулосодержащие морулярные (сферулярные) клетки (Chia, Xing, 1996). Морулоподобные клетки синтезируют ряд гуморальных факторов защиты, участвуют в инкапсуляции чужеродных микроорганизмов, осуществляют синтез компонентов соединительной ткани, они задействованы в процессах заживления ран и регенерации. Это малоподвижные клетки, практически не образуют псевдоподий, но способны к медленному амебоидному движению. Основную часть цитоплазмы занимают крупные плотно упакованные, одетые мембраной базофильные гранулы-сферулы. Они важны для инициации агрегации целомоцитов, что является начальным этапом и реакций гомеостаза, и инкапсуляции (Подгорная, Исаева, 1985). Среди морулоподобных клеток иногда выделяют несколько подтипов клеток: красные (содержащие эхинохром), бесцветные и малые морулярные клетки (Johnson, 1969; Nobaus, 1980; Кудрявцев, Полевщиков, 2004; Arizza et al., 2007). Бесцветные морулярные клетки участвуют в иммунной защите организма посредством высвобождения цитотоксических лизинов (Arizza et al., 2007).

Ювенильные (лимфоцитоподобные) клетки характеризуются округлой формой, способны иногда образовывать филоподии. Этим клеткам приписывается роль общего предшественника для всех клеточных типов (Магарламов, 2004).

Целомоциты иглокожих также включают жгутиковые клетки (вibroциты), кристаллические клетки и гемоциты (Коренбаум, Воробьев, 1988; Исаева, Коренбаум, 1989; Магарламов, 2004). Однако эти клетки присутствуют не у всех представителей иглокожих и не несут иммунных функций (Chia, Xing, 1996).

Численность целомоцитов, равно как и уровень экспрессии генов защитных факторов, является крайне чувствительной к изменениям гомеостаза (Ramirez-Gomez et al., 2010). Необходимо отметить способность целомоцитов к продукции АФК. Установлено, что амебоциты морской звезды *A. rubens* в ответ на введение бактерий способны продуцировать супероксиданион радикал O_2^- и пероксид водорода. Значимое место в иммунных реакциях занимает и оксид азота (NO), который целомоциты иглокожих продуцируют в ответ на стимуляцию (Beck et al., 2001). Известно, что способность к продукции NO и других АФК является универсальным ответом фагоцитов как первично-, так и вторичноротых животных и играет у них ведущую роль в иммунных реакциях (Кудрявцев, Полевщиков, 2004).

Показана цитотоксическая активность для целомоцитов этих животных. Из клеток морских ежей *Paracentrotus lividus* удалось выделить гранулы, содержащие цитотоксичные факторы. По-видимому, среди циркулирующих целомоцитов можно выделить популяцию цитотоксичных клеток, осуществляющих киллинг путем высвобождения энзимов и цитоплазматических гранул (Pagliara, Canicatii, 1993).

Таким образом, обладая иммунными механизмами, свойственными большинству беспозвоночных животных (фагоцитоз, инкапсуляция, цитотоксичность), иглокожие проявляют также некоторые реакции, характерные для системы врожденного иммунитета высших позвоночных животных (наличие предковых форм цитокинов, комплемента, синтез АФК). Все это свидетельствует о наличии высокого уровня врожденного иммунитета при отсутствии адаптивного иммунитета (Кудрявцев и др., 2005; Гусев, Черешнев, 2012). Следует отметить, что иммунитет голотурий остается одним из наименее изученных среди иглокожих.

Особенности состава целоцитов голотурии *E. fraudatrix*. В исследованиях иммунных клеток голотурий значительно больше внимания уделено составу и морфологии, чем их функциям и механизмам иммунного ответа.

Установлено, что наиболее характерными типами клеток этих животных являются: амебоциты, морулоподобные клетки, лимфоцитоподобные клетки, жгутиковые клетки, кристаллические клетки (Елисейкина, Магарламов, 2002). Еще один тип клеток – гемоциты – присутствует не у всех голотурий: у представителей отр. *Aspidochirota* (Chia, Xing, 1996), в том числе и у дальневосточного трепанга, гемоциты отсутствуют (Елисейкина, Магарламов, 2002).

Голотурия *E. fraudatrix* (Djakonov et Baranova) является одним из распространенных видов голотурий Дальнего Востока (Дьяконов и др., 1958). Встречается от литорали до глубины 13 м в Японском море. Длина ее тела обычно не превышает 7 см, поверхность тела имеет кремовый или розовый цвет. У голотурии *E. fraudatrix* описано шесть типов целоцитов. Самым многочисленным из которых, как и других голотурий, являются амебоциты, и среди которых выделяются субпопуляции мелких и крупных клеток, различающихся объемом цитоплазмы и степенью развитости гетеросинтетического аппарата. В большей степени он развит у крупных амебоцитов, где представлен длинными концентрически расположенными вокруг ядра цистернами шероховатого эндоплазматического ретикулума и диктиосомами аппарата Гольджи. По-видимому, эти две субпопуляции можно рассматривать как стадии жизненного цикла клеток одного типа (амебоцитов), представляющих молодые и зрелые клетки (Елисейкина, Магарламов, 2002). Как и у других иглокожих (Edds, 1984), у *E. fraudatrix* на прижизненных препаратах выделяются две формы амебоцитов – петалоидная и филоподиальная.

Следующей по численности субпопуляцией целоцитов у *E. fraudatrix* являются гранулосодержащие морулярные клетки, выделяют несколько разновидностей морулярных клеток. К «молодым» морулярным клеткам отнесены клетки сравнительно небольшого размера, содержащие немногочисленные секреторные гранулы. По мере созревания морулярных клеток происходит нарастание количества секрета. У «зрелых» морулярных клеток свободная цитоплазма отсутствует, и весь ее объем заполнен секреторными гранулами. Наиболее многочисленной разновидностью морулярных клеток являются клетки, у которых цитоплазма клеток заполнена гетерогенными

секреторными гранулами. Другой разновидностью морулярных клеток у голотурий являются клетки, содержащие гомогенные гранулы, заполненные фибриллярным секретом, состоящим из кислых полисахаридов и белков (Canicatti et al., 1989; Магарламов, 2004).

Ювенильные клетки являются низкодифференцированными и, вероятно, могут рассматриваться как предшественники, по крайней мере, некоторых линий дифференцировки целомоцитов. Часть ювенильных клеток имеет более развитую цитоплазму, содержащую либо многочисленные везикулы (ювенильные клетки I разновидности), либо плотно расположенные цистерны шероховатого эндоплазматического ретикулума (ювенильные клетки II разновидности). Вероятно, первая разновидность дает начало клеткам амебоцитарного, а вторая – морулярного рядов дифференцировки целомоцитов (Магарламов, 2004).

В целомической жидкости голотурии *E. fraudatrix*, помимо преобладающих по численности амебоцитов, морулярных и ювенильных клеток присутствуют также жгутиковые клетки, кристаллические клетки и гемоциты (Магарламов, 2004).

Фагоциты *E. fraudatrix*, как и у морских ежей *Strongylocentrotus purpuratus* (Lindsay et al., 1972) и *S. droebachiensis* (Edds, 1984), разделяются на две субпопуляции. При центрифугировании в градиенте плотности фиколл-верографина у голотурии *E. fraudatrix* были выделены две фракции фагоцитов: Ф1 (до 98 % чистоты) и Ф2 (90-94 % чистоты). Кроме того, также была выделена фракция, относительно обогащенная морулоподобными клетками (МК) до 64 % чистоты (Dolmatova et al., 2003).

1.3. Апоптоз в клетках иммунной системы

Общие представления. Известно, что апоптоз - программированная гибель клеток – естественный процесс, предназначенный для элиминации лишних клеток в ходе развития, в поддержании гомеостаза, а также аутореактивных иммунных клеток, клеток с нерепарабельными повреждениями или представляющими угрозу для организма (Цыган, 2004; Zeng et al. 2015).

Этот вид смерти клеток осуществляется путем включения специализированной генетической программы и сопровождается определенными морфологическими изменениями клетки. Морфологические изменения клеток, претерпевающих апоптоз, включают потерю клеткой объема, тогда как клетки, погибающие по механизму некроза, разбухают. Хроматин конденсируется, формируя мелкие диффузные

образования, которые могут сливаться и мигрировать к ядерной мембране в виде круглых плотных структур. Ядра часто расщепляются на апоптозные тельца, которые могут содержать или не содержать хроматин. И сама клетка может расщепляться на множество апоптозных телец, содержащих фрагменты ядра, или спадаться и превращаться в единичное, круглое плотное апоптозное тело (Hacker, 2000). Биохимические изменения при апоптозе включают специфическое расщепление ДНК, рибосомальной РНК и белков, повышение внутриклеточного уровня ионов кальция, потерю митохондриального трансмембранного потенциала и высвобождение из митохондрий цитохрома с, выделение фосфатидилсерина из внутренней плазматической мембраны. Апоптозные клетки обычно остаются мембраносвязанными, что исключает воспалительную реакцию. Распознавание апоптозных клеток фагоцитирующими клетками отчасти обусловлено выделением фосфатидилсерина во время апоптоза (Агол, 1996; Матвеева, 2003; Zeng et al. 2015).

В основе апоптоза – фрагментация ДНК Ca^{2+} - Mg^{2+} -зависимыми эндонуклеазами, расщепляющими ДНК в межнуклеосомных сайтах на 180-200-нуклеотидные олигомеры, которая визуализируется в агарозном гель-электрофорезе в виде так называемой «апоптозной лестницы» (Gerschenson, Rotello, 1992). Целый ряд генов, которые тесно связаны с клеточной пролиферацией и канцерогенезом, также ассоциирован с апоптозом и регуляция этих процессов имеет общие механизмы. Дерегуляция контроля клеточного цикла может приводить клетку на путь апоптоза, дерегуляция апоптоза – способствовать канцерогенезу. Механизм апоптоза включает сложную сеть блокаторов и индукторов клеточной смерти, действующих разнонаправленно в тонком равновесии для достижения тканевого гомеостаза (Цыган, 2004).

Физиологическая гибель иммунокомпетентных клеток существенна для протекания иммунологических реакций и происходит наряду с их пролиферацией в интактном тимусе и периферических лимфоидных органах. В этом случае апоптоз является частью механизма, связанного с клональной селекцией лимфоцитов и регуляцией величины их популяции (Робинсон, Труфакин, 1991). По достижении зрелости клетки иммунной системы становятся устойчивыми к индукции апоптоза. Однако, описаны некоторые ситуации, при которых удается вызвать апоптоз зрелых лимфоцитов (Ярилин, 1996).

По чувствительности к факторам, индуцирующим или ослабляющим апоптоз, нейтрофилы отличаются от других лейкоцитов, хотя и располагают набором основных эффекторов апоптоза. Зрелые гранулоциты, циркулирующие в крови, уже имеют начальные морфологические признаки апоптоза (фрагментация ядра, конденсация хроматина), процесс их гибели развивается необратимо в течение 2-3 суток. Гранулоциты первыми поступают в очаг воспаления, где активируются и после гибели (преимущественно посредством апоптоза) удаляются макрофагами. Способность регулировать программу собственной гибели, адаптируя ее к внешним условиям, указывает на присутствие в нейтрофилах факторов, управляющих сигналами в системе апоптоза. Нейтрофилам отпущена едва ли не самая короткая жизнь среди других клеток, но они могут либо продлевать ее, либо делать еще короче (Маянский и др., 1999; Полетаева и др. 2009).

Механизмы апоптоза. В апоптозе задействовано около сотни молекул, которые проявляют активность на разных этапах, усиливают или задерживают его развитие, связаны между собой в каскадных и сетевых взаимодействиях, а также дублируют друг друга. Важную роль в механизмах апоптоза играют каспазы – семейство цистеиновых протеаз (Kaufmann, Earnshaw, 2000; Широкова, 2007; Zeng et al. 2015).

Каспазы делятся на инициаторные (каспазы 8, 9, 10) (Но, Hawkins, 2005) и эффекторные (в основном каспазы 3, 6 и 7 и 14) (Kaufmann, Earnshaw, 2000). Каспаза 2 обладает как иницирующими, так и эффекторными функциями. Каспаза 9 служит медиатором митохондриального пути апоптозного сигналинга. Эффекторные каспазы активируются расщеплением инициаторными каспазами. Необратимое расщепление специфических белковых клеточных субстратов эффекторными каспазами приводит к морфологическим изменениям, распознаваемым как апоптоз (Цыган, 2004; Shalini et al. 2015).

В иммунной системе чаще других реализуется Fas-индуцированный апоптоз (Потапнев, 2002). Ген Fas играет существенную роль в развитии и функционировании клеток иммунной системы, также идентифицирован естественный лиганд рецептора Fas. Взаимодействие лиганда, локализованного на поверхности цитотоксических Т-лимфоцитов, с Fas-рецептором на клетках-мишенях является одним из механизмов, активирующих программу апоптотической гибели клеток-мишеней (Певницкий, 1996). Как правило, Fas-индуцированный апоптоз не требует синтеза макромолекул *de novo* и

не зависит от Ca^{2+} . Fas экспрессируется на многих типах клеток, причем его экспрессия усиливается при активации клеток, а в некоторых ситуациях через Fas может передаваться активационный сигнал. В ряде случаев прослежено изменение экспрессии Fas в процессе дифференцировки клеток (Ярилин, 1996).

Кроме того, одну из главных ролей в регуляции апоптоза играют митохондрии. В случае митохондриального пути запуска каспазного каскада ключевым звеном является изменение состояния митохондрий, при котором снижается мембранный потенциал на внутренней мембране, в ней образуются гигантские поры, матрикс набухает, разрывается наружная мембрана, из митохондрий выходит ряд белков, в частности цитохром с. Цитохром с в цитоплазме клетки участвует в формировании апостомы, которая приводит к образованию эффекторной каспазы 3 (Широкова 2007). Каспаза 3, действуя на комплекс CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) с ингибитором ICAD, отщепляет и инактивирует последний (Fan et al., 2005). Свободная CAD вызывает межнуклеосомные разрывы ДНК и образование фрагментов в 180-200 пар оснований (Широкова 2007; Zeng et al. 2015).

Митохондрии являются ключевым звеном в передаче сигнала во время апоптоза, связанного с повреждением ДНК при действии на клетку разных факторов, в частности радиации, активных форм кислорода, высокой температуры и др. Важную роль при этом играет белок p53. Отсутствие или мутация гена p53 приводит к блокированию апоптоза и способствует развитию злокачественных новообразований из-за прекращения элиминации злокачественных клеток. При действии ультрафиолетового излучения, радиации, химиопрепаратов и других факторов, приводящих к нарушениям структуры ДНК, уровень p53 повышается. Помимо передачи сигнала в митохондрии, p53 может участвовать в активации экспрессии проапоптозных генов и подавлении экспрессии антиапоптозных генов (Широкова, 2007).

В клетках существует сбалансированная система регуляции апоптоза, в которой в качестве факторов, сдерживающих апоптоз, выступают bcl-2. Семейство клеточных белков bcl-2 насчитывает 17 членов. Ген bcl-2 кодирует основной член данного семейства, митохондриальный антиапоптозный белок bcl-2, который экспрессируется в клеточных типах, характеризующихся большой продолжительностью жизни: нейронах, иммунных клетках памяти и т.д. Экспрессия bcl-2 продлевает жизнь В- и Т- клеток

памяти и поддерживает долговременный иммунный ответ. Семейство bcl-2 включает в себя субсемейства, различающихся функционально и структурно:

субсемейство bcl-2 наиболее близких гомологов (bcl2, bcl-X, bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1) – ингибиторов апоптоза.

белки суперсемейств bax (bax, bak, bok) и BH3 (bik, blk, hrk, bim, bad) – промоутеров апоптоза (Цыган, 2004).

От соотношения активности этих белков зависит, состоится апоптоз или нет.

Апоптоз у беспозвоночных. Филогенетически апоптоз прослеживается, начиная с амёб и нематод, хотя типичный феномен запрограммированной гибели клеток характерен главным образом для многоклеточных организмов. Первые доказательства наличия генетической программы клеточной смерти были получены на беспозвоночных животных *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster* (выявлены два гена ced-3 и ced-4, продукты которых вызывают апоптоз, а также ген – ced-9, который является супрессором апоптоза) (Hengartner, 1996; Kumar, Doumanis, 2000). Генетический анализ и изучение молекулярных и биохимических особенностей апоптоза, в том числе эффекторов клеточной смерти – каспаз, подробно изучено на насекомом *D. melanogaster* (Kumar, Doumanis, 2000).

Апоптоз со всеми его характерными признаками, такими как изменение формы и объема клетки, конденсация хроматина, фрагментация ядра, описаны у различных моллюсков (Sunila, LaBanca, 2003; Sokolova et al., 2004). Более того, многие молекулярные компоненты апоптозных механизмов также обнаружены у моллюсков. Клетки моллюсков (в том числе и гемоциты), подобно клеткам позвоночных животных, обладают каспаза 3-подобной активностью (Pirger et al., 2008; Romero et al., 2011). Ее может активировать цитохром c, а также стауроспорин (ингибитор клеточных протеинкиназ). Исследования показали, что сигнальные пути регуляции апоптоза у моллюсков и позвоночных имеют большое сходство. Найдено, что циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), является ключевым эффектором в апоптозе моллюсков, однако его роль может быть как про- так и антиапоптотической (Lacoste et al., 2002; Pirger et al., 2008). Гомолог белка p53 также играет важную роль в апоптозе моллюсков (Böttger et al., 2008). Клетки моллюсков, в том числе гемоциты, содержат синтазу оксида азота (фермент, катализирующий реакцию получения оксида азота) и продуцируют NO (Terehara, Takahashi, 2008), однако роль последнего в регуляции апоптоза у моллюсков

подробно не исследована (Sokolova, 2009). Известно, что ингибирование активности синтазы оксида азота в процессе личиночного метаморфоза *Ilyanassa obsoleta* стимулирует апоптоз клеток апикального ганглия, а в гемоцитах моллюска, продукция NO увеличивается в результате воздействия паразитов или патогенов, а также цитокина ИЛ-2 (Barsia, Ramos-Martinez, 2008; Terahara, Takahashi, 2008).

Однако данных об исследовании апоптоза в иммунных процессах иглокожих, в частности иммунных клеток, недостаточно. Вместе с тем, увеличивающийся поток исследований этих животных (Roccheri et al., 1997; 2002; Willoughby, Pomponi, 1999; Maria et al., 2006; Долматов и др., 2014), связанный с использованием их, как модельных объектов, в том числе, в изучении иммунитета, обуславливает необходимость выяснения особенностей апоптоза иглокожих. Подавляющее число исследований апоптоза у иглокожих проведено на эмбрионах морского ежа (Galasso et al., 2019). Выявлено, что клетки ооцитов и ранних эмбрионов этих животных обладают необходимыми апоптотическими механизмами, и их активация ведет к появлению характерных апоптотических признаков. Яйца морского ежа, закончив мейоз и перейдя в состояние покоя, все еще подвержены апоптозу. Апоптоз у морских ежей, как и у позвоночных, сопровождается морфологическими изменениями клеток. Так, в ооцитах, яйцах и ранних эмбрионах морского ежа *Lytechinus variegatus*, обработанных стауроспорином, обнаружена активация каспаз, уплотнение и деградация хроматина (Voronina, Wessel, 2001). В эмбрионах, обработанных цитотоксичными химическими соединениями и высокой температурой (Roccheri et al., 2002), ультрафиолетовой радиацией, ингибиторами синтеза белка и ингибиторами топоизомеразы (Vega, Epel, 2004; Vega Thurber, Epel, 2007) также происходит фрагментация ДНК, изменение проницаемости мембран и активация каспаз. Молекулярные механизмы, приводящие к этим морфологическим апоптотическим изменениям клеток морского ежа, остаются до конца не выясненными. Существуют доказательства того, что подавление активности протеинкиназы C может приводить к апоптозу клеток морского ежа (Dickey-Sims et al., 2005). Расшифрован геном морского ежа *S. purpuratus* (Sodergren et al., 2006), и идентифицированы гомологи компонентов апоптотических путей позвоночных (Robertson et al., 2006). Геном *S. purpuratus* содержит пять классов каспаз, включая четыре каспаза-9 подобных гена, каспаза3/7 подобный ген, каспаза 6 подобный ген, пять каспаза-8/10 подобных гена и четырнадцать других каспазаподобных генов (Robertson et al., 2006). У

этих животных обнаружены также десять генов гомологов белков семейства bcl-2 (Robertson et al., 2006). У морского ежа *P. lividus* идентифицировано 13 генов, вовлеченных в запрограммированную клеточную гибель в процессе эмбрионального развития (Galasso et al., 2019).

Ооциты и яйца морской звезды также подвержены апоптозу: в ооцитах, обработанных 1-метиладенином или ультрафиолетовой радиацией, наблюдаются характерные морфологические признаки апоптоза (Yuce, Sadler, 2001). Морфологической особенностью гибели ооцитов морской звезды посредством апоптоза является каспаза 3 подобная активность и приостановка оплодотворения запуском MAP киназного пути апоптоза. Это апоптоз, индуцируемый с помощью митоген-активируемых протеинкиназ JNK и p38, которые в свою очередь воздействуют на белки-мишени, связанные с функционированием факторов транскрипции и регуляцией: p53, активаторный белок транскрипции (AP-1), ядерный фактор каппа В (NF-kB) (Gallo, Johnson, 2002).

Несмотря на исследования апоптоза у некоторых классов иглокожих, апоптоз у голотурий остается малоизученным. Имеются данные о том, что апоптоз играет роль в механизмах гибели фагоцитов голотурии *Apostichopus Japonicus* (Долматова и др. 2001). Также известно, что выделен Fas-ассоциированный домен смерти – HLFADD, вовлеченный в апоптоз (Zhao et al., 2019). Отсутствие данных об апоптозе и его механизмах в отдельных типах иммуноцитов голотурий, по-видимому, связано со слабой изученностью их роли в иммунном ответе.

1.4. Антиоксидантная ферментативная система и ее участие в апоптозе иммунокомпетентных клеток

Известно, что окислительно-восстановительный баланс определяет стабильность гомеостаза живого организма. В результате нарушения этого баланса накапливаются токсические продукты. Выраженность свободнорадикальных процессов обусловлена уровнем генерации АФК. К АФК относятся: супероксидный анион-радикал ($O_2^{\bullet-}$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (OH^{\bullet}), оксид азота (NO), пероксинитрит ($HOONO$) и др. (Брудастов и др., 2008; Vebiano et al., 2005; Rejendran et al. 2014). Классическим примером свободнорадикальных процессов является перекисное окисление липидов (ПОЛ), протекающее в биологических мембранах (Дубинина, 2001). Скорость свободнорадикального окисления и концентрация свободных радикалов

поддерживаются на определенном уровне антиоксидантной системой. Действие патогенных факторов и активация эндогенных механизмов свободнорадикального окисления приводят к напряжению механизмов антиоксидантной защиты и развитию окислительного стресса. В результате происходит повреждение клеток или тканей, т. к. окислительный стресс может проявляться на клеточном, тканевом и организменном уровнях (Меньшикова и др., 2006).

Биохимическая антиоксидантная система включает: специализированные ферментные системы и неферментные соединения. Важнейшим из последних является глутатион. Глутатион – трипептид, образованный аминокислотами цистеином, глутаминовой кислотой и глицином, существует в восстановленной и окисленной формах, является ингибитором АФК и стабилизирует клеточные мембраны. Ему принадлежит ведущая роль в нейтрализации гидроксильного радикала, он также является основным агентом, защищающим тиоловые ферменты (многие оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы и лигазы) от окисления. Глутатион участвует в структурных изменениях мембран эритроцитов. Снижение концентрации глутатиона ослабляет устойчивость организма к гипоксии, как за счет инактивации ферментов пентозомонофосфатного цикла, так и за счет ингибирования тиоферментов тканевого дыхания. Из-за дефицита восстановленного глутатиона нарушается механизм переноса электронов в рамках тканевого дыхания. При этом уменьшается утилизация кислорода тканями, что усугубляет метаболические нарушения в клетках (Boonous, Molson, 2003; Popov et al. 2015).

К антиоксидантным ферментам можно отнести супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, глутатионзависимые пероксидазы, глутатионредуктазу (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ). Эта группа ферментов, локализующихся преимущественно внутриклеточно, обладает способностью разрушать свободные радикалы, а также участвовать в разложении гидроперекисей нерадикальным путем. Ферменты антирадикальной защиты характеризуются высокой избирательностью действия, направленного против определенных радикалов, специфичностью клеточной и органной локализации, а также использованием в качестве стабилизаторов металлов переменной валентности – меди, цинка, марганца, железа и др. (Подколзин, 2000; Rejendran et al. 2014).

СОД (КФ 1.15.1.1.) – ключевой фермент антиоксидантной защиты; он представляет собой группу металлопротеинов, обеспечивающих превращение супероксидного анион-радикала в менее активный окислитель – перекись водорода и воду (Меньшикова и др., 1997; Хвощевская, 2005). Существует несколько видов СОД: CuZnСОД содержится почти во всех клетках эукариот, в основном в цитозоле, также в ядре, лизосомах, пероксисомах и между внутренней и внешней мембранами митохондрий; MnСОД обнаружена в бактериях, растениях и животных, в тканях животных и дрожжей она локализована в митохондриях. MnСОД катализирует аналогичную реакцию дисмутации как и CuZnСОД, но имеет другую молекулярную массу и отличается по своему строению.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) обеспечивает расщепление перекиси водорода до двух молекул воды и кислорода; из-за большого молекулярного веса практически не проникает через клеточные мембраны (Камбачокова, 2011; Jeong, Joo, 2016). Так как СОД катализирует реакцию дисмутации супероксиданион-радикала с образованием воды и перекиси водорода, а каталаза обезвреживает перекись водорода, то эти два фермента взаимосвязано осуществляют защиту клетки от АФК. СОД и каталаза обладают слабой активностью по отношению к липидным пероксидам, образующимся в ходе цепных реакций ПОЛ. Разрушение этих продуктов осуществляется с участием ферментной системы глутатиона.

К ферментам системы глутатиона относятся селенсодержащая глутатионпероксидаза, глутатионтрансферазы и глутатионредуктаза.

Глутатионпероксидаза (КФ 1.11.1.9), имеющая в составе активного центра Se, эффективно разлагает гидрофильные гидроперекиси липидов и перекись водорода, катализирует реакцию восстановленного глутатиона с гидроперекисями липидов, при этом последние превращаются в жирные окисленные кислоты и восстанавливает перекиси белкового и нуклеиновокислотного происхождения. Она локализована в цитозоле и митохондриях (Руднева, 2003).

Основными функциями глутатионтрансфераз (или глутатион-S-трансфераз) (КФ 2.5.1.18) являются: детоксикация ксенобиотиков, редокс-регуляция чувствительности клеток к апоптозу, детоксикация продуктов окислительного стресса. При этом используется восстановленный глутатион.

Семейство ГТ включает глутатионтрансферазы, которые взаимодействуют с катионами (в печени, кишечнике, почках) и анионами (головной мозг, селезенка, легкие, плацента, эритроциты). В зависимости от субстратной специфичности также различают глутатионтрансферазу, которая взаимодействует с эпоксидами, алкенами, алкилами, алканами, арилами, энтеротоксинами (Руднева, 2003; Калинина и др. 2014).

Глутатионредуктаза (КФ 1.6.4.2) – катализирует реакцию восстановления глутатиона, окисляющегося при инактивации органических перекисей (Руднева, 2003).

Практически все ферментные антиоксидантные системы всегда выполняют свою функцию внутри клетки. Их синтез и внутриклеточное содержание, как и у большинства белков, находится под генетическим контролем и возрастает под влиянием ряда внешних воздействий, к которым относятся и фармакологические (введение лекарственных препаратов). Большая молекулярная масса молекул ферментов препятствует их выходу за пределы клеток. Уровень ферментных антиоксидантных систем крови крайне низок и суммарно определяет менее 1% ее антирадикальной и антиперекисной активности.

Известно, что макрофаги обладают высоким уровнем продукции АФК, и, как следствие, высокой активностью антиоксидантных ферментов. При этом АФК могут регулировать фенотип макрофагов (He, Carter, 2015).

Окислительный стресс, индуцированный АФК, играет существенную роль в индукции и развитии апоптоза (Меньшикова и др., 2006). Несмотря на очевидную взаимосвязь окислительного стресса с апоптозом, роль конкретных форм АФК в саморазрушении клеток и механизмы реализации цитотоксичности неясны. Более того, нет однозначного ответа на вопрос, чем является окислительный стресс – следствием или индуктором функциональных изменений, сопровождающих развитие запрограммированной гибели клеток (Зенков, 1999; Jeong, Joo, 2016).

По способности нарабатывать АФК нейтрофилы превосходят все другие клетки организма, что делает их опасными не только для экзогенных бактерий и микроорганизмов, но и для тканей собственного организма. Усиление продукции АФК и развитие окислительного стресса предшествует апоптозу гранулоцитов. Гипоксия, которая провоцирует апоптоз других клеток, задерживает его у нейтрофилов (Hannah et al., 1995). Возможно, это объясняется тем, что нейтрофилы практически лишены митохондрий и не нуждаются в энергии, запасаемой при аэробном дыхании. Они

используют кислород для «взрывного» образования биооксидантов в системе НАДФ·Н-оксидазы, и всякая активация, затрагивающая кислородзависимый аппарат биоцидности, создает опасность оксидантного стресса и сопряженного с ним апоптоза. При этом фагоцитоз бактерий задерживает апоптозный процесс нейтрофилов, ускоряя его у моноцитов (Baran et al., 1996). Однако в других исследованиях поглощение таких же бактерий усиливало апоптоз нейтрофилов (Маянский, 1999).

Ведущую роль АФК в инициации апоптоза иммунокомпетентных клеток подтверждают также работы, проведенные на лимфоцитах человека (Меньшикова, Зенков, 1997; Плетюшкина и др., 2006; Артюхов и др., 2011). Установлено, что АФК индуцируют фрагментацию ДНК лимфоцитарных клеток человека через 20 часов после воздействия. С использованием метода ДНК-комет выявлено, что повреждения ДНК (однонитевые разрывы) обнаруживаются сразу после добавления пероксида водорода в концентрации 10^{-6} моль/л и достигают своего максимума через 6 ч после воздействия АФК на клетки (Артюхов и др., 2011).

Помимо нейтрофилов и лимфоцитов в апоптоз, индуцированный окислительным стрессом, могут вступать и другие иммунные клетки, например, макрофаги. Известно, что макрофаги играют важную защитную и регуляторную роль в иммунитете. В неблагоприятном микроокружении макрофаги активируют самозащитный «стресс-ответ». Однако длительная активация макрофагов и чрезмерная продукция провоспалительных медиаторов могут инициировать многочисленные заболевания. Для ограничения чрезмерного воспалительного ответа в макрофагах может запускаться апоптоз. Баланс между защитным стресс-ответом и апоптозом определяет судьбу активированных макрофагов. Стресс-ответ и апоптоз контролируется NO. В провоспалительных макрофагах внутриклеточный NO играет проапоптотическую роль, тогда как в противовоспалительных – антиапоптотическую (Малышева и др., 2007; Sagar et al., 2017).

В физиологических условиях деструктивное действие АФК сдерживается многоуровневой системой антиоксидантов. Высокая оксидантная активность фагоцитов позвоночных нуждается в особенно строгом контроле, и поэтому клетки этих животных имеют также высокую антиоксидантную ферментативную активность (Зенков, 1999).

Важная роль каталазы в подавлении апоптоза иммунных клеток показана на тимоцитах (дифференцирующихся в тимусе Т-лимфоцитах). Так, установлено, что

удаление образующейся перекиси водорода из среды инкубации тимоцитов с помощью каталазы приводило к подавлению апоптоза клеток. Снижение же концентрации $O_2^{\bullet-}$ в среде инкубации с помощью СОД такого эффекта не давало (Volsky et al., 2001). Более того, повышенная активность СОД, превращающая $O_2^{\bullet-}$ в H_2O_2 , тормозит пролиферативные реакции клеток и способствует развитию апоптоза (Персиянова, Вольский, 2003).

На нейтрофилах позвоночных также показано, что каталаза, внесенная в среду инкубации, во многих случаях предотвращает апоптоз (Hannah et al., 1995; Curi et al., 1998). Вместе с тем, при апоптозе нейтрофилов, индуцированном поглощением бактерий *E.coli*, активность каталазы не менялась, а в защите от апоптоза участвовали неферментативные антиоксиданты – диметилсульфоксид, глутатион и N-ацетилцистеин; на скорость спонтанного апоптоза антиоксиданты не влияли. Противоречивые результаты получены и в опытах с супероксиддисмутазами, которые могли как подавлять апоптоз нейтрофилов (Mn-СОД), так и не влиять на него (Cu,Zn-СОД) (Маянский, 1999). Влияние антиоксидантных ферментов в апоптозе мононуклеарных фагоцитов мышей имеет свои особенности. Было показано, что апоптоз моноцитов, индуцированный морфином, эффективно предотвращался как СОД, так и каталазой (Bhat et al., 2004). Показано и участие ферментов системы глутатиона в защите от апоптоза. Так, индуцированный стероидными гормонами апоптоз клеток культуральных линий (WENI7.2 и S49.1), полученных из тимуса мышей, сопровождается активацией синтеза ГТ (Зенков и др., 1999).

Известно, что целоמוциты беспозвоночных, в том числе и морских беспозвоночных, также обладают ферментативной антиоксидантной защитой. Однако существуют некоторые отличия особенностей внутриклеточной локализации и субстратной специфичности для каталазы и СОД по сравнению с ферментами млекопитающих (Saint-Denis et al., 1998). Следует отметить, что исследования антиоксидантной ферментативной активности у морских беспозвоночных были проведены преимущественно на целых организмах моллюсков и крабов, или их тканях, накапливающих токсические вещества, или участвующих в детоксикации (гепатопанкреас, пищеварительная железа) (Lee, 1988; Regoli et al., 1998; Holmblad, Soderhall, 1999). При этом установлено присутствие активности всех антиоксидантных ферментов (Sparks et al., 2019). Также было установлено, что в тканях голотурии *A.*

japonicus значительно увеличивается активность СОД и каталазы при изменении температуры воды ± 4 °C (Dong et al., 2008).

Многие беспозвоночные животные являются оксиконформными животными и чувствительны к изменениям концентрации кислорода во внешней среде. Это обуславливает значительную сезонную и возрастную динамику активности антиоксидантных ферментов у этих животных (Tschischka et al., 2000; Долматова и др. 2004). Так, у моллюска *Crassostrea virginica* было показано снижение активности антиоксидантных ферментов с увеличением возраста. Уровни поглощения кислорода и оксидантного стресса при этом зависели еще и от репродуктивного цикла, но не от температуры морской воды (Ivanina et al., 2008). Сходным образом, у голотурии *A. japonicus* с увеличением длины тела уменьшалась активность СОД и каталазы (Dolmatova et al., 2010).

Было исследовано влияние теплового стресса на иммунную систему и ответ к окислительному стрессу у голотурии *Holothuria scabra*. Обнаружено, что повреждения ДНК и пероксидация липидов, вызванные тепловым стрессом, приводили к увеличению активности СОД, каталазы и ГР. После периода акклиматизации иммунные и антиоксидантные реакции предотвращали повреждение и поддерживали гомеостаз (Kamyab et al., 2017).

В фагоцитах голотурии *E. fraudatrix* также была выявлена высокая активность антиоксидантных ферментов (Долматова и др., 2004). Активности СОД и каталазы во фракции фагоцитов были значительно выше, чем во фракции, обогащенной морулоподобными клетками или в неразделенных целомоцитах. Уровень продукции АФК в фагоцитах был также примерно в 1,6 раза выше, чем во фракции, относительно обогащенной морулоподобными клетками (Dolmatova et al., 2003). Значительно более высокие значения СОД и каталазы, а также уровень продукции АФК в фагоцитах голотурии *E. fraudatrix* по сравнению с этими показателями во фракции, относительно обогащенной морулоподобными клетками, по-видимому, отражает различную функциональную активность этих клеток (Долматова и др. 2004). Это подтверждается при сравнении активности антиоксидантных ферментов в фагоцитах и морулоподобных клетках при воздействии простагландина E_2 , которое выявило большую напряженность антиоксидантной системы фагоцитов. При этом развитие апоптоза во фракции фагоцитов голотурии *E. fraudatrix* при введении простагландина E_2 в небольших

концентрациях (0,1 и 1 мкг/г), происходило на фоне снижения антиоксидантной ферментативной защиты, особенно активности каталазы. Напротив, при увеличении концентрации простагландина E₂ (10 мкг/г) происходило ингибирование апоптоза на фоне стимуляции активности каталазы и при значительном росте активности ГР, что, по-видимому, обеспечивало восполнение пула восстановленного глутатиона. Эти данные свидетельствуют о важной роли антиоксидантных ферментов в защите фагоцитов голотурии от апоптоза (Долматова, Заика, 2007).

1.5. Взаимодействие иммунных клеток

Межклеточные взаимодействия играют ключевую роль на разных этапах становления и функционирования иммунной системы – они определяют развитие иммуноцитов, направление их миграции, осуществление многих эффекторных функций. Межклеточная кооперация в иммунной системе осуществляется либо путем непосредственных контактных взаимодействий клеток друг с другом (прямые контакты), либо с помощью цитокинов, называемых «белками связи» или АФК, в частности перекиси водорода (гуморальные влияния) (Ярилин, 1999; Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Наибольшим своеобразием и специфичностью обладают межклеточные взаимодействия, реализуемые в процессе развития иммунного ответа. Известно, что для полноценного функционирования иммунной системы и полноценного иммунного ответа необходима кооперация как минимум трех типов клеток: Т- и В-лимфоцитов и макрофагов (Claman, 1966; Mosier, Coppleson, 1968; Галактионов, 1997).

Среди видов контактных взаимодействий клеток различают несколько типов. Это взаимодействия, связанные с презентацией антигена, в которых участвуют антигенпредставляющие клетки (дендритные клетки, макрофаги, В-лимфоциты) и Т-хелперы. Также имеют место взаимодействия, связанные с реализацией иммунного ответа. В них участвуют Т-хелперы и предшественники эффекторных клеток (В-лимфоциты и предшественники Т-киллеров). Основой для контакта клеток служит распознавание антигена рецепторами лимфоцитов. В случае взаимодействия антигенпредставляющих клеток и Т-хелперов – это распознавание комплекса антигенного пептида с молекулой главного комплекса гистосовместимости II класса Т-клеточным рецептором TCR-CD3 при участии молекулы CD4.

Необходимо отметить, что лейкоциты экспрессируют особые у каждой субпопуляции поверхностные молекулы, которые могут служить маркерами.

Значительная часть этих маркеров легко идентифицируется с помощью моноклональных антител. Разработана систематизированная номенклатура маркерных молекул; в ней группы моноклональных антител, каждая из которых специфически связывается с определенной маркерной молекулой, обозначены символом CD (Cluster Designation) (Ярилин, 1999).

Кооперация между клетками может носить взаимонаправленный характер. При этом наблюдается активация обеих взаимодействующих клеток, что может инициировать самостоятельные цепи событий (Ярилин, 1999). Так, доказано участие тучных клеток в пролиферации и дифференцировке Т-лимфоцитов *in vitro* (Nakano et al., 2009). Показано, что в естественных условиях воспаления тучные клетки оказывают тормозящее влияние на Т-лимфоциты, которые, соответственно, растормаживаются при удалении тучных клеток и что модулирующее влияние тучных клеток на гемопоэз при воспалении во многом реализуется через Т-лимфоциты (Гольдберг и др., 1993). Известно о влиянии биологически активных веществ тучных клеток на Т-лимфоциты *in vitro*. Так, установлено, что гистамин через H₂-рецепторы угнетает пролиферацию, продукцию лимфокинов и цитотоксичность Т-лимфоцитов. Наличие H₂-рецепторов доказано на цитотоксических Т-лимфоцитах и естественных киллерах, продуцентах лимфокинов и Т-супрессорах. Предполагается, что в зависимости от вида животного и субпопуляции лимфоциты обладают как H₂-, так и H₁-рецепторами, и стимуляция последних оказывает обратные эффекты. Эти данные позволяют предполагать, что модулирующее влияние тучных клеток на лимфоциты во многом зависит от эффектов гистамина, осуществляемых через H₂-рецепторы (Гольдберг и др., 1993). Также обнаружено, что удаление тучных клеток приводит к более раннему повышению ИЛ-1 костномозговыми макрофагами. Это свидетельствует о том, что модулирующее влияние тучных клеток на гемопоэз при воспалении во многом реализуется через изменение синтеза ИЛ-1 макрофагами. В естественных условиях воспаления тучные клетки стимулируют функциональную активность макрофагов и моноцитов, приводя к повторному усилению продукции ИЛ-1 (Клименко и др., 1993). Существует и вариант опосредованных отношений, когда тучные клетки продуцируют медиаторы, обеспечивающие адгезию Т-лимфоцитов к фибробластам в результате экспрессии на Т-лимфоцитах молекул клеточной адгезии (Meng et al., 1995). Однако и лимфоциты

оказывают влияние на тучные клетки: Т-лимфоциты способны инициировать синтез цитокинов тучными клетками (Bhattacharyya et al., 1998).

Изучение механизмов кооперации иммунокомпетентных клеток привело к формированию одного из наиболее перспективных направлений в иммунологии, связанного с изучением роли гуморальных факторов (цитокинов) в реализации клеточного взаимодействия (Галактионов, 1997; Turner et al., 2014). Чтобы состоялся эффективный иммунный ответ, который мог бы своевременно выключиться, необходимы четкие межклеточные взаимодействия, которые обеспечиваются цитокинами (Фрейдлин, 1996; Turner et al., 2014). В настоящее время известно около 20 цитокинов, осуществляющие реальную связь между клетками – продуцентами и мишенями.

ИЛ-1 является самым древним в эволюционном плане цитокином и найден у многих типов животных. ИЛ синтезируются лимфоидными и нелимфоидными клетками и оказывают прямое действие на иммунокомпетентные клетки, обеспечивая взаимосвязь отдельных видов лейкоцитов в иммунном ответе (Земсков и др., 1997). ИЛ-1 является медиатором воспалительной реакции (Бехало и др., 2009), участвует в регуляции иммунного ответа (созревание, пролиферация и функциональная активность иммунокомпетентных клеток), вызывает лихорадку, активизирует лимфоциты и нейтрофилы. ИЛ-1, продуцируемый макрофагами в ответ на проникновение патогена, способен запускать каскад продукции других цитокинов, таких как ИЛ-2,3,4,5,6,7, которые связываются с соответствующими рецепторами на Т-лимфоцитах, В-лимфоцитах и других клетках, передавая им сигналы активации отдельных функций. ИЛ-2 участвует в процессе развития и усиления иммунного ответа.

Цитокины способны не только активировать, но и подавлять функции других клеток. Так, ИЛ-4, активатор В-лимфоцитов, является ингибитором клеточного иммунного ответа, подавляет синтез гамма-интерферона (ИНФ- γ). ИНФ- γ , со своей стороны, являясь активатором макрофагов, стимулирует продукцию всех воспалительных цитокинов (ИЛ-1,6 и ФНО), в то же время способен ингибировать продукцию ИЛ-4. Некоторые продукты Т-лимфоцитов, например, ИЛ-10, выполняют только ингибиторные функции. Так, ИЛ-10 способен затормозить синтез всех воспалительных цитокинов, в том числе, ИЛ-1, гамма-интерферона. В связи с этим, в противоположность воспалительным цитокинам, он получил название

противовоспалительного (Фрейдлин, 1996). Среди продуктов, нарабатываемых макрофагами в очаге инфекции, есть и ФНО- α . ФНО- α имеет непосредственное отношение к мобилизации клеток в очаг инфекции. Благодаря ему в эндотелиальных клетках активируются гены, ответственные за синтез молекул адгезии, которые обеспечивают прилипание к сосудистой стенке циркулирующих в крови нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов. ФНО- α помогает и самим макрофагам, способствуя увеличению их количества в очаге инфекции. Кроме того, у макрофагов имеются рецепторы для ФНО- α , через которые он может активировать другие макрофаги, посылая с поверхности этих клеток сигналы к ядру, после чего включаются гены, необходимые для организации ответа на заражение (Фрейдлин, 1996; Turner et al., 2014).

Возрастающий интерес вызывает участие цитокинов в регуляции гибели клеток иммунной системы. Цитокины, выделяемые клетками при межклеточной кооперации, могут оказывать апоптотическое или антиапоптотическое действие на взаимодействующие клетки в зависимости от природы этих цитокинов (Потапнев, 2002). ИЛ-3,5,6,7,9,12 задействованы в апоптозе иммуноцитов (Кадагидзе, 2003). ФНО- α является мощным индуктором апоптоза различных клеток. ИЛ-2 может выступать как в качестве проапоптотического, так и антиапоптотического цитокина в отношении активированных Т-лимфоцитов, ИЛ-1 выделяется в макрофагах, которые подвергаются апоптозу (Тотолян, Фрейдлин, 2000).

Роль апоптоза возрастает в условиях активации клеток, когда он выступает в роли процесса, альтернативного пролиферации. На ранних стадиях лимфопоэза клетки весьма чувствительны к развитию апоптоза, избежать которого им удастся при достаточной концентрации ростовых факторов (прежде всего ИЛ-7), или при действии стимулов, приводящих к экспрессии bcl-2 или bcl-x_L.

Апоптоз зрелых лимфоцитов осуществляется при их ответе на стимуляцию антигеном. Адгезия клеток и формирование полного сигнала, достаточного для активации лимфоцитов, достигается с помощью взаимодействия ряда вспомогательных молекул системы CD (Kooten, Vanchereau, 1996; Ярилин, 1999). Так, связывание CD28 порождает сигналы, без которых оказываются недостаточно действенными каскады реакций, которые завершаются активацией цитокиновых генов, в первую очередь ИЛ-2. Показано также, что под влиянием связывания CD28 усиливается выработка ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5 и ФНО- α (Lenshow et al., 1996). Установлено, что костимуляция через

CD28 усиливает экспрессию фактора bcl- χ_L (Bearer, Hahn, 1993) и предполагается, что в отсутствие этой костимуляции активированные Т-клетки быстро погибают, что также способствует ослаблению иммунных процессов, зависящих от Т-клеток (Ярилин, 1999).

Роль сигнальных молекул при гуморальном взаимодействии клеток позвоночных также могут играть АФК. Известно, что H_2O_2 , в отличие от $O_2^{\bullet-}$, может свободно проникать через клеточные мембраны, таким образом осуществляя передачу апоптотического сигнала между клетками (Меньшикова, Зенков, 1997; Плетюшкина и др., 2006; Costantini et al. 2011). Хорошая проницаемость пероксида водорода через биологические мембраны объясняется отсутствием у этой молекулы заряда. В клетках млекопитающих возможна облегченная диффузия H_2O_2 через клеточные мембраны при помощи белков аквапоринов. Пероксид водорода играет важную роль в клеточной пролиферации, дифференцировке, миграции и апоптозе (Ткачук и др., 2012).

Известно, что иммунный ответ у некоторых морских беспозвоночных животных, как и у позвоночных, осуществляется при взаимодействии различных иммуноцитов, и может координироваться гуморальными продуктами (Ottaviani, 2004; Arizza, 2007). На возможность цитокинрегулируемого иммунного ответа указывает наличие цитокиноподобных веществ, структурно и функционально близким цитокинам, молекулы которых обнаружены у моллюсков, иглокожих и у других морских беспозвоночных (Ottaviani et al., 1995, 2004; Ottaviani, 2006). Цитокиноподобные молекулы (ИЛ-2, ИЛ-8), стимулирующие хемотаксис, фагоцитоз, цитотоксичность, стрессовый ответ, регенерацию и регуляцию клеточной смерти выявлены в иммунных клетках беспозвоночных, у моллюсков также описаны рецепторы к ИЛ-2, стимуляция которых индуцирует синтез NO и других АФК (Barcia, Ramos-Martinez, 2008). Однако, для голотурий таких данных не найдено.

Изучение способности клеток иглокожих отвечать специфическим синтезом цитокиноподобных молекул является важным в понимании эволюции иммунных реакций и механизмов клеточного распознавания, кооперации клеток, промежуточных между реакциями позвоночных и беспозвоночных. Установлено, что клиренс организма у беспозвоночных, как и у позвоночных животных, от патогенов опосредуется через кооперативное действие гуморальных и клеточных механизмов защиты (Kurtz, 2004). Эффект прямой цитотоксичности, проявляющийся в выраженном гемолизе эритроцитов, опосредован гемолитическими факторами агрегатов целоцитов морской звезды *A.*

forbesi, образовавшихся в ходе межклеточной кооперации. Цитотоксичность целомоцитов *A. forbesi* нарастает под влиянием рекомбинантного ИЛ-1 α человека (Дьячков и др., 2006). Дьячков и др. (2006) получили данные о влиянии иммуноактивных молекул человека на свойства целомоцитов иглокожих и о временной динамике продукции цитокиноподобных молекул (ФНО- α) иглокожих в ответ на антигенную и митогенную стимуляцию.

У морской звезды *A. forbesi* также обнаружены аналоги главных иммунорегуляторных молекул – цитокинов - позвоночных: ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО- α -подобные молекулы, а также рецепторы к ним (Malagoli, 2010; Beck, 1998; Beschin, 2001; Legas et al., 1996; Raftos, 1991). Исследования Beck и Nabicht (1994), демонстрирующие, что отдельные виды иммуноцитов и клеточные экстракты морской звезды *A. forbesi* стимулируют пролиферацию тимоцитов мышей, индуцируя синтез ИЛ-1-подобной молекулы, указывают на возможность взаимодействия иммуноцитов иглокожих посредством гуморальных веществ. В работе Дьячкова и Кудрявцева (2007) обсуждается вопрос о механизмах кооперации иммунных клеток морской звезды *A. rubens*. О возможности кооперации судили по числу циркулирующих целомоцитов, уровню продукции ими активных форм кислорода, динамике выведения гемоглобина и бактерий из целомической жидкости. При изучении метаболической и пролиферативной активности целомоцитов в ответ на митогенную стимуляцию *in vitro* установлено, что время элиминации растворимых и корпускулярных антигенов составило 12-24 часов. В ответ на иммунизацию происходило увеличение числа циркулирующих клеток и усиление продукции АФК. Усиление пролиферативной активности *in vitro* предшествовало повышению синтеза $O_2^{\bullet-}$ циркулирующими клетками в опытах *in vivo* (Дьячков, Кудрявцев, 2007). Быстрый рост синтеза $O_2^{\bullet-}$ у иммунизированных морских звезд косвенно указывает на продукцию медиаторов (цитокиноподобных веществ), что в свою очередь позволяет ставить вопрос о наличии межклеточной кооперации в ходе активации целомоцитов на митогены как *in vivo*, так и *in vitro*. Кооперация отдельных фракций целомоцитов была также продемонстрирована в работе (Arizza et al., 2007): обнаружена высокая цитотоксическая активность в смешанной фракции фагоцитов и морулоподобных клеток морского ежа *P. lividus* по отношению к эритроцитам кролика (гемолиз составил 78 %). В то время как при раздельном воздействии фракций фагоцитов или морулоподобных клеток цитотоксическая активность была ниже.

Предполагается, что гуморальные вещества, высвобождаемые из активированных фагоцитов, могут стимулировать высвобождение цитотоксичных лизоцимов из морулоподобных клеток (Arizza et al., 2007). Для голотурий данные о гуморальной регуляции иммунного ответа практически отсутствуют. Вместе с тем у этих животных, несмотря на кажущуюся простоту строения их иммунной системы, отмечается высокая эффективность иммунной защиты (Xing, Chia, 2000; Gu et al., 2010). Ряд авторов высказывают также мнение о наличии у них В- и Т-лимфоцитоподобных клеток (Елисейкина, Магарламов, 2002; Endean, 1966; Xing et al., 2008; Ramirez-Gomez, Garcia-Arregas, 2010). Можно предполагать, что у иглокожих, как и у позвоночных, иммунный ответ может осуществляться по типу контролируемого взаимодействия клеток.

1.6. Гормональная регуляция функциональной активности иммунокомпетентных клеток

Гормональная регуляция иммунного ответа у позвоночных. Изучению механизмов регуляции иммунных реакций у позвоночных посвящены многочисленные исследования (Цыган, 2004; Bloom et al., 2004; Zen et al., 2011), поскольку понимание этих процессов позволяет судить о функционировании иммунной системы и дает ключи к правильному применению экзогенных модулирующих воздействий (Персиянова, 2003).

Одними из основных физиологических регуляторов иммунной системы являются глюкокортикоидные гормоны, основным местом синтеза которых являются надпочечники. Наиболее активным глюкокортикоидом, образующимся в организме человека, является гидрокортизон (кортизол), другие, менее активные, представлены кортизоном, кортикостероном, 11-дезоксикортизолом, 11-дегидрокортикостероном. Глюкокортикоидные гормоны - класс стероидных гормонов, которые способны регулировать множество иммунных реакций, в том числе такие процессы, как пролиферация и апоптоз клеток иммунной системы (Зенков и др., 1999; Volsky et al., 2001; Herold et al., 2006; Xing et al. 2015), что в свою очередь определяет дальнейшее развитие иммунного ответа как по клеточному, так и по гуморальному типу.

Механизм действия глюкокортикоидных гормонов на молекулярном уровне до конца не выяснен. Считают, что действие глюкокортикоидных гормонов на клетки-мишени осуществляется главным образом на уровне регуляции транскрипции генов. Оно опосредуется взаимодействием глюкокортикоидов со специфическими

глюкокортикоидными внутриклеточными рецепторами (Greenstein et al., 2002; Меркулов и др., 2015). Эти ядерные рецепторы способны связываться с ДНК и относятся к семейству лиганд-чувствительных регуляторов транскрипции (Mangelsdorf et al., 1995). Рецепторы глюкокортикоидов обнаружены практически во всех клетках (Yamamoto, 1985; Greenstein et al., 2002). В разных клетках количество рецепторов варьирует, они также могут различаться по молекулярной массе, сродству к гормону и другим физико-химическим характеристикам. При отсутствии гормона внутриклеточные рецепторы, которые представляют собой цитозольные белки, неактивны и входят в состав гетерокомплексов, которые включают также белки теплового шока, иммунофилины. Белки теплового шока способствуют поддержанию оптимальной конформации гормоносвязывающего домена рецептора и обеспечивают высокое сродство рецептора к гормону (Pratt et al., 1996; Herold et al., 2006). После проникновения через мембрану внутрь клетки глюкокортикоидные гормоны связываются с рецепторами, что приводит к активации комплекса. При этом олигомерный белковый комплекс диссоциирует – отсоединяются белки теплового шока и иммунофилин. В результате этого рецепторный белок, входящий в комплекс в виде мономера, приобретает способность димеризоваться. Вслед за этим образовавшийся комплекс «глюкокортикоид + рецептор» транспортируется в ядро, где взаимодействует с участком ДНК, расположенным в промоторном фрагменте стероид-отвечающего гена, глюкокортикоид-отвечающим элементом и стимулирует процесс транскрипции определенных генов (Меркулов и др., 2015). Многие из этих генов стимулируются в ответ на воздействие глюкокортикоидных гормонов, в том числе и те, которые играют важную роль в активации, функционировании и апоптозе иммунных клеток, такие как ингибитор апоптоза - bcl-x_L (Gascoyne et al., 2003), ингибитор NF-κB (Deroo, Archer, 2001) и глюкокортикоид-индуцированный рецептор к ФНО (Nocentini et al., 1997) и др. Индукция транскрипции этих генов приводит к стимуляции или супрессии образования м-РНК и изменению синтеза различных регуляторных белков и ферментов, опосредующих клеточные эффекты. Глюкокортикоидные гормоны и их рецепторы взаимодействуют также с различными факторами транскрипции, такими как AP-1 (Heck et al., 1997), NF-κB (Heck et al., 1994) и др. (Herold et al., 2006). Показано, что ядерные факторы AP-1 и NF-κB являются регуляторами нескольких генов, принимающих участие в иммунном ответе и воспалении, включая гены цитокинов, молекул адгезии,

протеиназ (De Bosscher et al., 2000). Глюкокортикоиды вызывают множество эффектов, так как оказывают влияние на большинство клеток организма (Zen et al., 2011).

Эффекты стероидных гормонов проявляются и по негеномному механизму (Reichardt et al., 1998). После введения высоких доз глюкокортикоидов регистрируются быстрые негеномные эффекты глюкокортикоидов, которые реализуются в течение первых секунд и минут после воздействия препаратом (Тодосенко и др., 2017). Механизм негеномного действия глюкокортикоидов заключается в связывании на плазматической мембране клетки со специфическими рецепторами и активации каскадных реакций систем вторичных посредников, например фосфолипазы С, протеинкиназы С (Limbourg et al., 2002). Под влиянием глюкокортикоидных гормонов в клетке может увеличиваться содержание цАМФ, что активирует протеинкиназу С или снижаться синтез провоспалительных цитокинов. Это приводит к фрагментации ДНК и наступает апоптоз. На сегодняшний день описано четыре подкатегории негеномного действия глюкокортикоидов: мембранно-связанное, цитозольное, прямое физико-химическое взаимодействие глюкокортикоидов с клеточной мембраной и митохондриальная передача глюкокортикоидных сигналов (Тодосенко и др., 2017).

В регуляции глюкокортикоид-индуцированного апоптоза важную роль играют белки семейства bcl-2. Повышенная продукция bcl-2 лимфоидными клетками мышей защищает от глюкокортикоид-индуцированного апоптоза (Mann et al., 2000). Исследования, проведенные на Т-клеточных гибридах крыс, выявили, что повышенная экспрессия bcl-2 также блокирует высвобождение как цитохрома с, так и АИФ после обработки глюкокортикоидами (Susin et al., 1999). Важность bcl-2 в глюкокортикоид-индуцированном апоптозе также подтверждена в опытах на мышах со слабой экспрессией bcl-2, которые демонстрируют мгновенный апоптоз лимфоцитов в ответ на воздействие глюкокортикоидов (Veis et al., 1993). Так как Bcl-2 локализуется в митохондриях, то они играют существенную роль в глюкокортикоид-индуцированном апоптозе (Kaufmann et al., 2003). Роль Bcl-xL в этом процессе менее ясна. Повышенная экспрессия Bcl-xL в Т-клеточных гибридах крыс блокирует апоптоз этих клеток, вызванный глюкокортикоидами (Memon et al., 1995).

Установлено, что чувствительность иммунных клеток к проапоптотическому действию глюкокортикоидов зависит от стадии их дифференцировки и их функционального предназначения. Пре-Т-клетки, незрелые Т-клетки тимуса, НК-

клетки, цитолитические Т-лимфоциты, а также незрелые В-лимфоциты претерпевают апоптоз под действием глюкокортикоидных гормонов. Зрелые же Т- и В-клетки относительно резистентны к их апоптотическому действию (Zhou et al., 2009). Глюкокортикоидные гормоны задерживают спонтанный и индуцированный апоптоз нейтрофилов (Маянский и др., 1999). В моноцитах и макрофагах глюкокортикоиды увеличивали уровень апоптоза через 24 часа после воздействия (Zen et al., 2011).

Для глюкокортикоидов известно противовоспалительное, противоаллергическое и иммунодепрессивное действие. Противовоспалительное действие глюкокортикоидных гормонов обусловлено многими факторами, ведущим из которых является подавление активности фосфолипазы А2. При этом глюкокортикоиды действуют опосредованно: они увеличивают экспрессию генов, кодирующих синтез липокортинов, индуцируют продукцию этих белков, один из которых – липомодулин – ингибирует активность фосфолипазы А2. Угнетение этого фермента приводит к подавлению высвобождения арахидоновой кислоты и торможению образования медиаторов воспаления – простагландинов, лейкотриенов. Противоаллергическое действие развивается в результате снижения синтеза и секреции медиаторов аллергии, торможения высвобождения из сенсibilизированных тучных клеток и базофилов гистамина и других биологически активных веществ, уменьшения числа циркулирующих базофилов, уменьшения количества Т- и В-лимфоцитов, тучных клеток (Шапорова и др., 2000). Характерной особенностью глюкокортикоидных гормонов является иммунодепрессивная активность, которая является результатом подавления разных этапов иммунной реакции: подавления активности Т- и В-лимфоцитов, угнетения высвобождения ИЛ-1, ИЛ-2, ИНФ- γ из лейкоцитов и макрофагов (Xing et al. 2015).

Глюкокортикоиды широко используются в клинической медицине в качестве специфических средств заместительной терапии и лечения заболеваний различной этиологии. Особенно широко используется синтетический стероид $11\beta,17\alpha, 21$ -тригидрокси-16 α -метил-9-фтор-прегна-1,4-диен-3,20-дион (дексаметазон). Дексаметазон относится к группе C_{21} – стероидов или кортикостероидов, основными представителями которой является кортизол, кортикостерон и альдостерон. Дексаметазон – это 9- α -фторпроизводное гидрокортизона, обладающее слабой минералкортикоидной активностью и в 20-40 раз превосходящее активность гидрокортизона по противовоспалительному эффекту. Гидрокортизон является основным

глюкокортикостероидом, образующимся в пучковой зоне коры надпочечников позвоночных. Предполагают, что присутствие в 9- α - положении атомов фтора усиливает глюкокортикоидную активность благодаря блокированию процесса гидроксильной деградации молекул стероидов в организме (Сергеев, 1984).

В фагоцитах было показано стимулирующее влияние глюкокортикоидных гормонов на продукцию клетками АФК, в частности O_2^- и перекиси водорода (Вольский и др., 1987). Персияновой и др. (1998) было обнаружено, что добавление дексаметазона в концентрации 100 мкМ значительно стимулирует НАДФН-оксидазную активность клеток тимуса (продукция O_2^- увеличивается в 2 раза). В тех случаях, когда глюкокортикоидные гормоны подавляют продукцию клетками АФК, в частности O_2^- и перекиси водорода, влияние гормонов объясняют подавлением экспрессии генов НАДФН-оксидазы, ферментного комплекса, ответственного за быструю продукцию АФК в ответ на внешние стимулы (Patel et al., 2000). Таким образом, глюкокортикоидные гормоны могут оказывать на продукцию АФК клетками неоднозначные эффекты (Persijanovna et al., 1996; Volsky et al., 2001).

В тоже время существуют работы, касающиеся непрямого влияния глюкокортикоидов на редокс-баланс клеток путем подавления антиоксидантных систем, что сдвигает этот баланс в сторону преобладания прооксидантов, то есть окислительного стресса, и обсуждается участие этого эффекта в механизме глюкокортикоид-индуцированного апоптоза (Персиянова, 2003). Так, после 24-часовой инкубации клеток в среде с дексаметазоном активность каталазы снижалась до 20% от начального уровня, Mn-SOD – до 30%, Cu,Zn-SOD – до 50%, концентрация восстановленного глутатиона уменьшилась до 80%. В гомогенатах тимоцитов, обработанных глюкокортикоидами, содержание восстановленного глутатиона снижалось параллельно возрастанию фрагментированной ДНК, концентрация окисленного глутатиона также падала, так что соотношение глутатион восстановленный / глутатион окисленный сохранялось (Зенков, 1999). В работе Volsky et al. (2001) было установлено, что при действии на тимоциты мыши дексаметазона в концентрации 100 мкМ существенно возрастала продукция O_2^- клетками в первые минуты после добавления гормона. С другой стороны, удаление образующейся перекиси водорода из среды инкубации клеток с помощью каталазы приводило к подавлению апоптоза тимоцитов, развивающегося под влиянием дексаметазона. Однако снижение

концентрации O_2^- в среде инкубации с помощью СОД такого эффекта не давало. Эти результаты свидетельствуют о том, что перекись водорода является медиатором глюкокортикоид-индуцированного апоптоза лимфоцитов. В настоящее время является общепризнанной роль перекиси водорода в развитии апоптоза, в том числе и дексаметазон-индуцированного (Jaramillo et al., 2009; Ткачук и др., 2012).

Гормональная регуляция иммунитета у морских беспозвоночных. Морские беспозвоночные вынуждены приспосабливаться к быстро меняющимся условиям внешней среды. Несомненно, что как для всех многоклеточных организмов, для обеспечения функциональной лабильности им необходим нейрохимический контроль.

У морских беспозвоночных, в том числе иглокожих, наиболее изучены нейропептидные гормоны (Cottrell et al., 1990; Grimmelikhuijzen, Hauser, 2012). Нейропептиды и их рецепторы появляются на ранних этапах эволюционного развития и уже широко распространены у низших животных с примитивной нервной системой. Они регулируют широкий спектр физиологических процессов и поведения животных. К таким нейрогормонам относятся окситоцин, вазопрессин, нейропептид Y и гликопротеиновые гормоны (Grimmelikhuijzen, Hauser, 2012). Нейропептидная сигнализация была широко исследована как у позвоночных, так и у беспозвоночных (например, *D. melanogaster*). Секвенирование генома морского ежа *S. purpuratus* позволило обнаружить предшественник тиреотропного гормона. Секвенирование нейронного транскрипта морских звезд *A. rubens* позволило идентифицировать 40 предшественников нейропептидов, в том числе первые предшественники кисспептина и меланина (Semmens, Elphick, 2017). У ракообразных обнаружен гипергликемический гормон, который играет важную роль в модуляции агрессии у беспозвоночных (Aquiloni et al., 2012). У моллюсков описана нейроэндокринная система и предложена ее модель (Heyland et al., 2012). В этой системе специфические сенсорные нейроны высвобождают пептиды экстрасинаптическим способом, в отличие от позвоночных и насекомых, у которых стимулирующий фактор из центральных сенсорных регионов центральной нервной системы в конечном итоге регулирует высвобождение гормонов в периферических железах (Heyland et al., 2012).

У голотурии *A. japonicus* также обнаружены нейрогормоны (Rowe, Elphick, 2014). У морских звезд обнаружен нейрогормон с гонадостимулирующей активностью (Mita, 2004).

Стероидные молекулы с гормональными функциями найдены у всех беспозвоночных (Lafond, Mathieu, 2007). У иглокожих наиболее изучены половые гормоны. У морских звезд обнаружен 1-метиладенин, прогестерон и тестостерон (Hines et al, 1992; Ламаш, 2002). В гонадах морского ежа *L. variegatus* проведена оценка уровня прогестерона, тестостерона и эстрадиола (Wasson et al., 2000). Также у этих животных обнаружены кортикостероиды (Gurst et al., 1973), а также рецепторы к стероидам (Lafond, Mathieu, 2007).

Глюкокортикоидные гормоны, как и у позвоночных, являются регуляторами многих физиологических процессов у иглокожих (Voogt et al., 1987; Leclerc, Bajelan, 1991; Heyland et al., 2004). Обнаружен цитолитический эффект гидрокортизона на аксиальный орган морской звезды *A. rubens*, причем эффект гидрокортизона был сходен с его влиянием на тимус позвоночных (Leclerc, Bajelan, 1991). Все это свидетельствует о возможности гормональной регуляции иммунного ответа и у этих животных.

В экспериментах на беспозвоночных животных, как и у позвоночных, используются синтетические аналоги глюкокортикоидных гормонов, в том числе и Dex. Так, в экспериментах на рачках *Ceriodaphnia dubia* продемонстрирован токсичный эффект Dex (Val et al., 2017).

Голотурии остаются одним из наименее изученных классов иглокожих в отношении механизмов иммунитета и их регуляции. Роль глюкокортикоидных гормонов в регуляции иммунитета голотурий остается мало изученной. Отсутствуют данные и о взаимодействии субпопуляций иммуноцитов голотурий, а также не исследованы возможные механизмы его регуляции. Вместе с тем, исследование механизмов взаимодействия иммуноцитов голотурии и его регуляции позволило бы не только пополнить представления об эволюции иммунитета, но и выявить возможные особенности иммунной системы иглокожих, что могло бы в дальнейшем послужить основой для разработки новых иммуномодуляторов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (Applichem, Германия), трис (гидроксиметил)аминометан (Sigma, США), фиколл-400 (Amersham, США), урографин (Натрия амидотризоат) (Shering, Испания), бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma, США), дексаметазон (KRKA, Словакия), трипановый синий (Sigma, США), бромистый этидий (Sigma, США), агароза тип 1 (универсальная) (Conda, Испания), Hoechst 33342 (ICN, США), фенилметилсульфонилфлуорид (Serva, Германия), ксантин (Sigma, США), нитросиний тетразолий (Sigma, США), ксантиноксидаза из коровьего молока (Sigma, США), кумасси синий G-250 (ICN, США), глутаровый альдегид (Reanal, Венгрия), гуанидин гидрохлорид (Sigma, США), 1-хлор-2,4-динитробензол (Sigma, США), ДНК-маркеры 100 bp (СибЭнзим, Россия), йодид пропидия (Molecular Probes, США), НАДФН (Sigma, США), глутатион окисленный (Sigma, США), глутатион восстановленный (Sigma, США), остальные реактивы – отечественного производства квалификации не менее ХЧ.

Объект исследования. Исследования проведены на голотуриях *E. fraudatrix* (с длиной тела 35-70 мм), которые были собраны на морских экспериментальных станциях «Восток» ИБМ ДВО РАН и «МЭС о. Попова» ТОИ ДВО РАН в заливе Петра Великого. До начала экспериментов в течение 2-4 недель животных содержали в аквариуме с проточной аэрируемой морской водой.

Получение клеточных фракций целоцитов. Животных надрезали скальпелем, целомическую жидкость отбирали в сосуд с антикоагулирующим раствором (1:2, об./об.) следующего состава: 30 mM ЭДТА, 31 г/л NaCl, 50 mM трис-HCl, pH 7,6 (Chia, Xing, 1996). Целомическую жидкость животных объединяли, затем по 2 мл наносили на ступенчатый градиент фиколл-урографина с удельной плотностью 1,077 г/мл в соотношении фиколл-урографина и антикоагулирующего раствора 1:0,4 (1-я ступень), 1:1 (2-я ступень) и 1:2 (3-я ступень) по объему (модификация метода Bertheussen, Seljelid) (1978) (рис. 1). Центрифугировали при 300 g в течение 15 мин при 5°C.

Отбирали первую фракцию фагоцитов (Ф1), полученную в интерфазе между образцом целомической жидкости и 3-й ступенью, и вторую фракцию фагоцитов (Ф2) - в интерфазе между 3-й и 2-й ступенями градиента. Фракцию, обогащенную

морулоподобными клетками (МК), получали в интерфазе между 2-й и 1-й ступенями градиента.

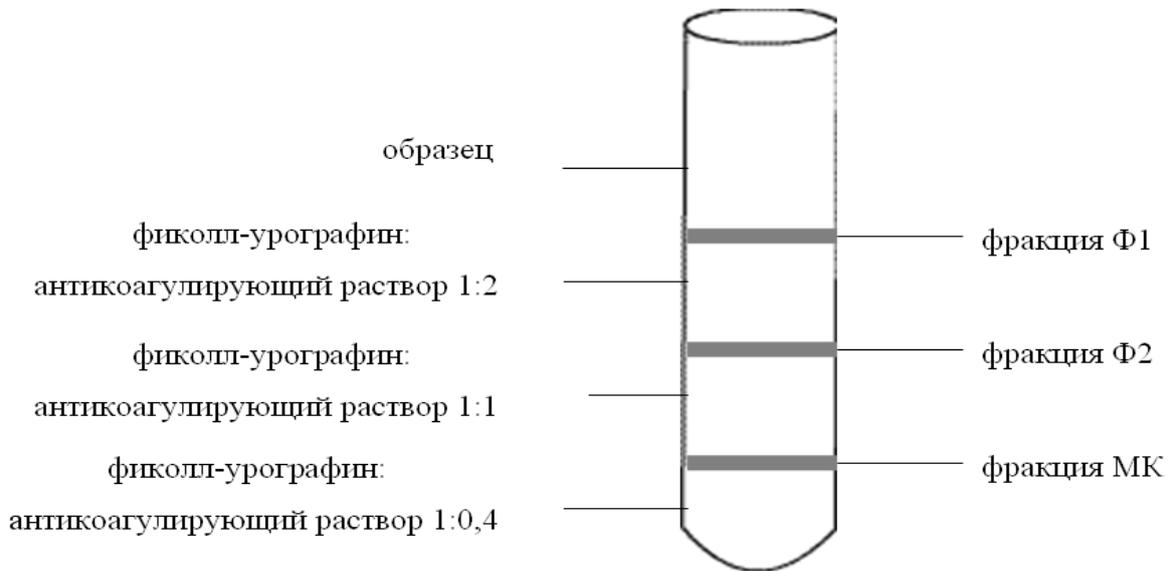


Рис. 1. Распределение целоцитов голотурии *E. fraudatrix* в ступенчатом градиенте фиколл-урографина.

Полученные клетки отмывали фосфатно-солевым буферным раствором с добавлением NaCl (115 г/л Na_2HPO_4 , 0,204 г/л KH_2PO_4 , 36 г/л NaCl, pH 7,6) (ФСБН) и ресуспендировали в среде 199, дополнительно содержащей на 1 л: 16,41 г NaCl, 0,264 г KCl, 0,87 г CaCl_2 , 4,98 г $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3,87 г, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22,74 г глицина, 0,1 г глюкозы, 2,5 г альбумина бычьего сывороточного (БСА), 50 мг гентамицина (модификация метода Одинцовой) (2001).

Концентрацию клеток определяли, используя камеру Горяева. Клетки окрашивали 1% раствором метиленового синего в ФСБН.

Жизнеспособность клеток в полученных фракциях определяли тестом исключения трипанового синего (0,2% раствор в ФСБН) (Phillips, 1973). Подсчет клеток производили в камере Горяева.

2.1. Проведение экспериментов

2.1.1. Влияние дексаметазона на уровни апоптоза, ИЛ-1 α -подобных веществ и активность антиоксидантных ферментов иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix*

Клеточные суспензии (Ф1, Ф2 или МК) (1 млн кл./лунку) инкубировали в круглодонных планшетах при 22°C с добавлением ФСБН (контроль) или раствора дексаметазона в ФСБН (Dex) в концентрациях 0,1; 1; 100 мкМ. Эксперимент осуществлялся в трех биологических повторностях, всего использовано 60 животных.

Отбор проб производили через 18, 24, 48 часов инкубации для последующего исследования. Для выяснения роли каталазы в дексаметазониндуцированном апоптозе к Ф1 добавляли раствор Dex в ФСБН (100 мкМ) и коммерческий препарат каталазы (70 мкг/мл) и инкубировали в течение 18, 24, 48 часов. Для определения активности антиоксидантных ферментов и концентрации ИЛ-1 α -подобных веществ (ИЛ-1 α -ПВ) часть суспензии клеток замораживали в жидком азоте и хранили при -18°C . Для исследования апоптоза суспензию центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин при 5°C , осадок клеток замораживали.

2.1.2. Исследование взаимодействия иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix* и влияния на него дексаметазона *in vitro*

Эксперимент осуществлялся в два этапа (рис. 2). На первом этапе (преинкубация клеток) целомическую жидкость от 20 животных объединяли, получали Ф1, Ф2 и МК и инкубировали в течение 3 или 24 ч с ФСБН или дексаметазоном (100 мкМ). По окончании инкубации центрифугированием получали супернатанты Ф1, Ф2 и МК, обработанных дексаметазоном (с(Ф1+Dex), с(Ф2+Dex), с(МК+Dex), соответственно) или ФСБН (сФ1, сФ2, сМК). На втором этапе полученные супернатанты добавляли к свежевыделенным суспензиям клеток (1 млн кл./1 мл) Ф1, Ф2 и МК в соотношении 1:1 по объему. В контрольные лунки добавляли ФСБН. Инкубацию проводили в течение 30 мин, 18 и 24 ч при температуре 22°C .

После отбора проб часть суспензии клеток замораживали в жидком азоте и хранили при -18°C до определения активности антиоксидантных ферментов и концентрации ИЛ-1 α -ПВ. Другую часть клеточной суспензии центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин при 5°C , осадок клеток замораживали и хранили до выделения ДНК. Для определения апоптоза окрашиванием Hoechst 33342 часть суспензии клеток центрифугировали при 300 g в течение 15 мин при 5°C , и осадок клеток фиксировали 4% раствором формалина. Эксперимент осуществлялся в трех биологических повторностях. Всего было использовано 180 животных.

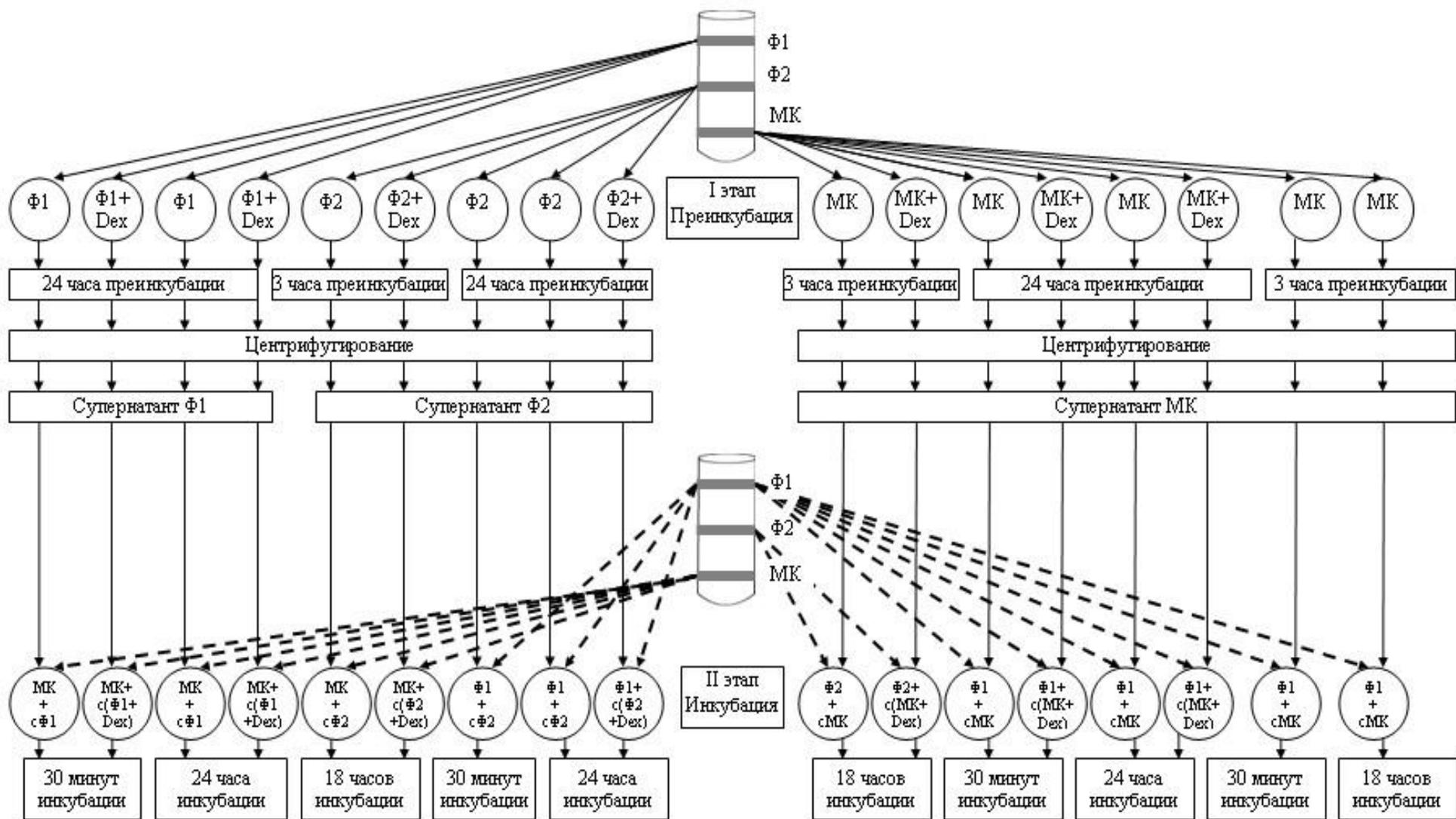


Рис. 2. Схема эксперимента по исследованию взаимодействия иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix* и влияния на него дексаметазона *in vitro*

2.1.3. Влияние дексаметазона на уровень апоптоза фагоцитов голотурии *E.*

fraudatrix in vivo

Животным в целомическую полость через прокол стенки тела вводили дексаметазон (1 или 10 мкг/г), часть животных получала ФСБН (контроль). Через 1 ч после инъекции выделяли целомическую жидкость, фракционировали целоциты и отбирали Ф1. Клетки фиксировали 70% ледяным этанолом для последующих исследований апоптоза методом проточной цитометрии. Эксперимент осуществлялся в двух биологических повторностях. Всего было использовано 24 животных.

2.1.4. Влияние дексаметазона, введенного *in vivo*, на взаимодействие

иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix*

Животные были разделены на группы (в каждой по 5 голотурий): I группа – интактные, II группа – введение в целомическую полость дексаметазона (10 мкг/г), III группа – введение ФСБН. Через 1 ч после инъекции у всех животных 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. Ф1 инкубировали в течение 1 ч при температуре 22°C. Супернатанты Ф1, полученные в группе II (с(Ф1+Dex, *in vivo*)) или III (сФ1+ФСБН, *in vivo*) добавляли к суспензиям МК (группа I) в соотношении 1:1 по объему. Инкубацию проводили в течение 24 ч при температуре 22°C и отбирали пробы для определения активности антиоксидантных ферментов. Эксперимент осуществлялся в трех биологических повторностях. Всего было использовано 45 животных.

2.2. Определение уровня апоптоза

Апоптоз определяли тремя методами.

2.2.1. Определение уровня апоптоза методом горизонтального электрофореза

ДНК в агарозном геле

Выделение ДНК проводили с использованием в качестве депротенизатора 8 М раствор гуанидингидрохлорида (Pramanick et al, 1976). Осадок клеток суспендировали в трех объемах лизирующего буфера (0,05 М трис-НСl (рН 7,6), 0,01 М ЭДТА, 1% додецилсульфат натрия). Инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем добавляли охлажденный раствор гуанидингидрохлорида (8 М гуанидингидрохлорид, 0,05 М трис НСl буфер, 0,01 М ЭДТА, рН 7,6) в соотношении 1:1 по объему. Образец осторожно встряхивали в течение 15 мин при комнатной температуре до полного

лизиса, добавляли равный объем смеси хлороформ – изоамиловый спирт (24:1 об./об.) и встряхивали 10 мин. Центрифугировали 20 мин при 1900 g, отбирали водный слой раствора ДНК. К оставшейся суспензии добавляли один объем лизирующего буфера (приготовленного без добавления додецилсульфата натрия). Центрифугировали 10 мин при 1900 g, отбирали водный слой раствора ДНК и объединяли с предыдущим, добавляли двойной объем охлажденного 70% этанола и выдерживали в течение 12 ч при температуре -4°C. Затем центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин. Удаляли надосадочную жидкость, осадок растворяли в трис-боратном буфере (89 mM трис, 89 mM борная кислота, 2,5 mM ЭДТА, pH 8,3).

Детекцию фрагментации ДНК проводили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (0,5 мг/л), в трис-боратном буфере (pH 8,3) (Маниатис и др., 1984; Девис и др., 1984). Электрофорез проводили в камере для электрофореза (Хеликон, Россия) при напряжении от 0,5 до 5 В/см. В качестве маркера молекулярной массы использовали синтетический ДНК-маркер с шагом в 100 пар оснований (100+1500 п.н.). ДНК и ее фрагменты идентифицировали фотографированием пластинок в проходящем ультрафиолетовом свете (длина волны 240 нм) на трансиллюминаторе Ultra-Violet Products (США).

2.2.2. Определение апоптоза с помощью окрашивания клеток Hoechst 33342

Окрашивание флуоресцентным голубым красителем Hoechst 33342 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).

Суспензию клеток наносили на предметные стекла и сушили на воздухе. Затем препараты помещали в раствор красителя Hoechst 33342 в ФСБН на 10 минут, выдерживая в темноте, после чего промывали их дистиллированной водой и сушили в темноте. После полного высыхания на препараты наносили смесь глицерина и ФСБН (50:50, об./об.) и накрывали покровным стеклом. Подсчет клеток производили на люминисцентном микроскопе Люмам-Р8 (Россия) при длине волны возбуждения 360 нм и эмиссии 470 нм и под микроскопом 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).

2.2.3. Определение апоптоза с помощью метода проточной цитометрии

Клетки, предварительно зафиксированные 70% ледяным этанолом (2.1.3), дважды отмывали ФСБН и окрашивали йодидом пропидия (10 мкг/мл) при 37°C 1 час в темноте. Цитометрию проводили на проточном цитометре FACScan (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA), используя программное обеспечение Cell Fit (Becton Dickinson). Апоптоз рассчитывали по проценту гиподиплоидных клеток (с меньшим количеством ДНК по сравнению с нормальными клетками).

2.3. Измерение активности антиоксидантных ферментов

При подготовке исследуемых образцов к суспензии клеток добавляли фенилметилсульфонилфлуорид в концентрации 10^{-3} М и разрушали клетки ультразвуком (22 кГц \times 100 с (5 раз по 20 с), 0°C), используя УЗ-гомогенизатор (УЗДН-1, Россия). Получали постядерный супернатант центрифугированием при 1000 g в течение 6 мин. Часть супернатанта отбирали для определения белка.

Активность ферментов измеряли на спектрофотометре СФ-56 (Россия). Измерения активности ферментов проводили в трех аналитических повторностях.

2.3.1. Определение активности супероксиддисмутазы.

Активность СОД определяли по подавлению восстановления нитросинего тетразолия супероксиданионрадикалами, образующимися в реакционной смеси ксантина и ксантиноксидазы (Beauchamp C., Fridovich I., 1971). Реакционную среду, содержащую 0,65 мл 0,1 М К-Na-фосфатного буфера (рН 8,3), 0,1 мл $2,5 \times 10^{-3}$ М ксантина, 0,1 мл $2,5 \times 10^{-4}$ М нитросинего тетразолия, 0,05 мл 1 М Na_2CO_3 , 0,05 мл 2×10^{-3} М ЭДТА добавляли в две кюветы. В опытную кювету добавляли ксантиноксидазу в объеме, обеспечивающем скорость реакции не более 0,25 единиц оптической плотности в минуту. Измеряли скорость ксантиноксидазной реакции на спектрофотометре в течение 2 мин при длине волны 560 нм. Затем в опытную кювету добавляли исследуемый образец в количестве от 0,005 мл до 0,02 мл (с содержанием белка до 3,75 мг/мл) и проводили измерение в течение 2 мин, при длине волны 560 нм. Активность фермента измеряли в условных единицах на 1 мг белка. За единицу активности СОД принимали количество фермента, необходимое для 50% подавления восстановления нитросинего тетразолия.

Активность СОД рассчитывали по формуле:

$$A = \left(\frac{\frac{\Delta D1}{t} - \frac{\Delta D2}{t}}{\frac{\Delta D1}{t}} \right) \times \frac{100\%}{50\%} \times b \times C$$

, где

A – активность фермента, усл.ед./мг белка; $\Delta D1$ – изменение оптической плотности при 560 нм до добавления образца; $\Delta D2$ – то же после добавлении образца; t – время реакции (мин); b – объем образца, мл; C – концентрация белка в образце, мг/мл.

2.3.2. Определение активности глутатионредуктазы.

Измерение активности ГР проводили по скорости снижения поглощения НАДФН (Юсупова, 1989). Реакционная среда содержала 1,5 мл 0,1 М КСl, 0,5 мл 0,2 М К-На-фосфатного буфера (рН 6,3), 0,25 мл 0,08 М ЭДТА, 0,1 мл 8×10^{-3} М глутатиона окисленного в 0,01 н NaOH, 0,1 мл 2×10^{-3} М НАДФН в 1% NaHCO₃ помещали в две кюветы. В опытную кювету добавляли исследуемый образец, содержащий 0,1-3,75 мг/мл белка. Измерение производили на спектрофотометре в течение 2 мин, в кварцевой кювете объемом 3 мл, при длине волны 340 нм.

Активность ГР рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta D}{t} \times \frac{V}{b \times 6,22 \times 1000 \times C \times l}$$

, где

A – активность фермента, ммоль/мин/мг белка; $\Delta D/t$ – изменение оптической плотности за 1 минуту; V – объем реакционной смеси, мл; b – объем образца, мл; C – концентрация белка в образце, мг/мл; 6,22 – коэффициент миллимолярной экстинции, $\text{мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$; 1000 – коэффициент пересчета л в мл; l – длина оптического пути кюветы, см.

Результат измерения активности ГР выражали в нмоль/мин/мг белка.

2.3.3. Определение активности глутатионтрансферазы.

Измерение активности ГТ проводили по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между глутатионом восстановленным и 1-хлор-2,4-динитробензолом (Nabig et al., 1974). Реакционная среда: 0,2 мл 10 мМ глутатиона восстановленного, 0,02 мл 12мМ 1-хлор-2,4-динитробензола, 1,78 мл 0,1 М К-На-фосфатного буфера (рН 6,3). В опытной кювете проводили измерение без образца в течение 2 мин и далее добавляли

исследуемый образец 50-100 мкл и производили замер также в течение 2 мин. Измерения проводились при длине волны 340 нм в кварцевой кювете объемом 3 мл.

Активность ГТ рассчитывали по формуле:

$$A = \left(\frac{\Delta D2}{t} - \frac{\Delta D1}{t} \right) \times \frac{V}{b \times 9,6 \times 1000 \times C \times l}, \text{ где}$$

A – активность фермента, ммоль /мин/мг белка; $\Delta D1/t$ – изменение оптической плотности без исследуемого образца за 1 мин; $\Delta D2/t$ – изменение оптической плотности с исследуемым образцом за 1 мин; V – объем реакционной смеси, мл; b – объем образца, мл; C – концентрация белка в образце, мг/мл; 9,6 – коэффициент миллимолярной экстинкции, $\text{мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$; 1000 – коэффициент пересчета л в мл; l – длина оптического пути кюветы, см.

Результат измерения активности ГТ выражали в ммоль /мин/мг белка.

2.3.4. Определение активности каталазы.

Активность каталазы определяли по скорости снижения поглощения перекиси водорода (Аеби, 1974). Состав реакционной смеси: 2,5 мл 0,05 М К-На-фосфатного буфера (рН 7,3), 0,05 мл исследуемого образца, 0,5 мл 0,3 % H_2O_2 . В контрольную кювету вместо 0,3% H_2O_2 вносили 0,5 мл H_2O . Измерение производили в кварцевой кювете объемом 3 мл, в течение 2 мин при длине волны 240 нм.

Активность каталазы рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{\Delta D}{t} \times \frac{V}{b \times 0,04 \times 1000 \times C \times l}, \text{ где}$$

A – активность фермента, ммоль/мин/мг белка; $\Delta D/t$ – изменение оптической плотности за 1 мин; V – объем реакционной смеси, мл; b – объем образца, мл; C – концентрация белка в образце, мг/мл; 0,04 – коэффициент миллимолярной экстинкции, $\text{мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$; 1000 – коэффициент пересчета л в мл; l – длина оптического пути кюветы, см.

Результат измерения активности каталазы выражали в мкмоль/мин/ мг белка.

2.4. Определение концентрации белка

Определение концентрации белка в пробах производили по методу Bradford (1976), используя в качестве стандарта БСА. Метод основан на сдвиге спектра поглощения красителя Кумасси синего G-250 в сторону 595 нм при связывании его с белком.

Для приготовления красителя 10 мг Кумасси синего G-250 растворяли при энергичном перемешивании в 5 мл 95% этанола, смешивали с 10 мл 85% фосфорной кислоты. Смесь доводили до 100 мл H₂O и фильтровали для удаления нерастворившегося красителя (Скоупс Р., 1985).

Концентрацию белка в пробах определяли в трех аналитических повторностях. Для построения калибровочного графика из стандартного раствора БСА готовили растворы (3-100 мкг/мл). Смешивали 1 мл образца или калибровочного раствора БСА и 1 мл красителя Кумасси синего G-250. Выдерживали пробы в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. Измерение оптической плотности производили в стеклянных кюветах объемом 1 мл на спектрофотометре СФ–56, при длине волны 595 нм. Расчет концентрации белка (мг/мл) в пробе производили, используя данные калибровочного графика.

2.5. Количественное определение ИЛ-1 α -подобных веществ

Суспензию размороженных клеток обрабатывали ультразвуком (22 кГц \times 100 с (5 раз по 20 с), 0°C), используя УЗ-гомогенизатор (УЗДН-1, Россия). Для получения постядерного супернатанта образцы центрифугировали 1000 g в течение 6 мин. Часть суспензии отбирали для определения белка. Количественную оценку уровней ИЛ-1 α -ПВ проводили иммуноферментным методом с использованием диагностических наборов для определения содержания ИЛ-1 α производства ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия) по рекомендациям изготовителя. Результаты реакции учитывались на микропланшетном фотометре ELX 800 UV (Bio-Tek Instruments, США). Измерения проводились при длине волны 450 нм. Результат выражали в пг/мг белка.

Статистические методы. В работе применяли следующие статистические методы: вычисление средних значений и средней ошибки. Сравнение выборок производили с помощью t-критерия Стьюдента. Во всех экспериментах различие между контролем и опытом считалось статистически достоверным при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние дексаметазона на уровни апоптоза, ИЛ-1 α -подобных веществ и активность антиоксидантных ферментов иммунных клеток голотурии *E. fraudatrix* *in vitro*

Влияние дексаметазона на апоптоз иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix* *in vitro*. Проведенные исследования показали, что в контрольных МК через 24 ч инкубации наблюдался низкий уровень апоптоза (рис. 3, а, б).

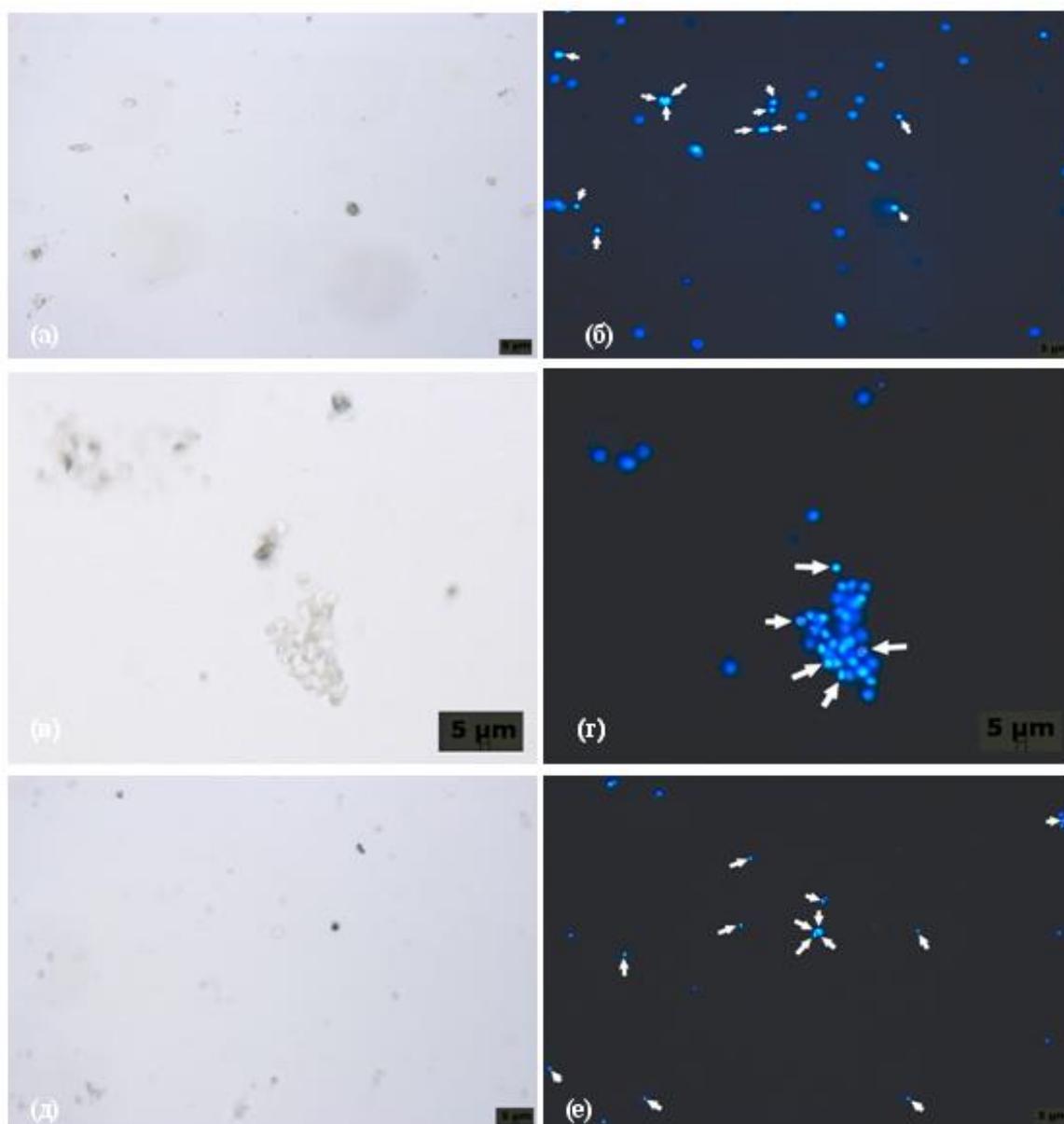


Рис. 3. Иммуноцитохимическое окрашивание красителем Hoechst 33342 ядер МК (а, б), Ф1 (в, г), Ф2 (д, е) через 24 ч инкубации. а, в, д – световая микроскопия; б, г, е – ядра клеток окрашены красителем Hoechst 33342 (синяя флуоресценция). Стрелками указаны апоптотические клетки с конденсированным хроматином.

Окрашивание Hoechst 33342 показало, что доля МК с признаками апоптоза составила $18,7 \pm 2,2\%$. (рис. 4).

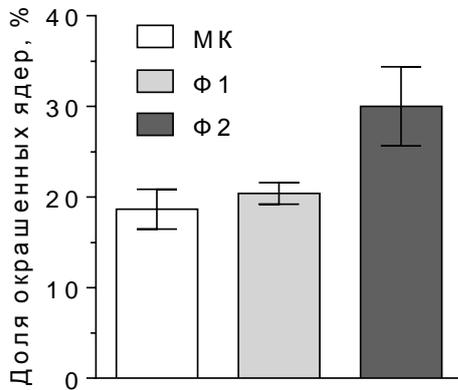


Рис. 4. Доля окрашенных Hoechst 33342 ядер МК, Ф1 и Ф2 через 24 ч.

Проведенный электрофорез ДНК в агарозном геле показал, что при инкубации МК с дексаметазоном (100 мкМ) в течение 24 ч происходил рост уровня апоптоза по сравнению с контролем, о чем свидетельствует появление характерной «лестницы» ДНК (рис. 5, а).

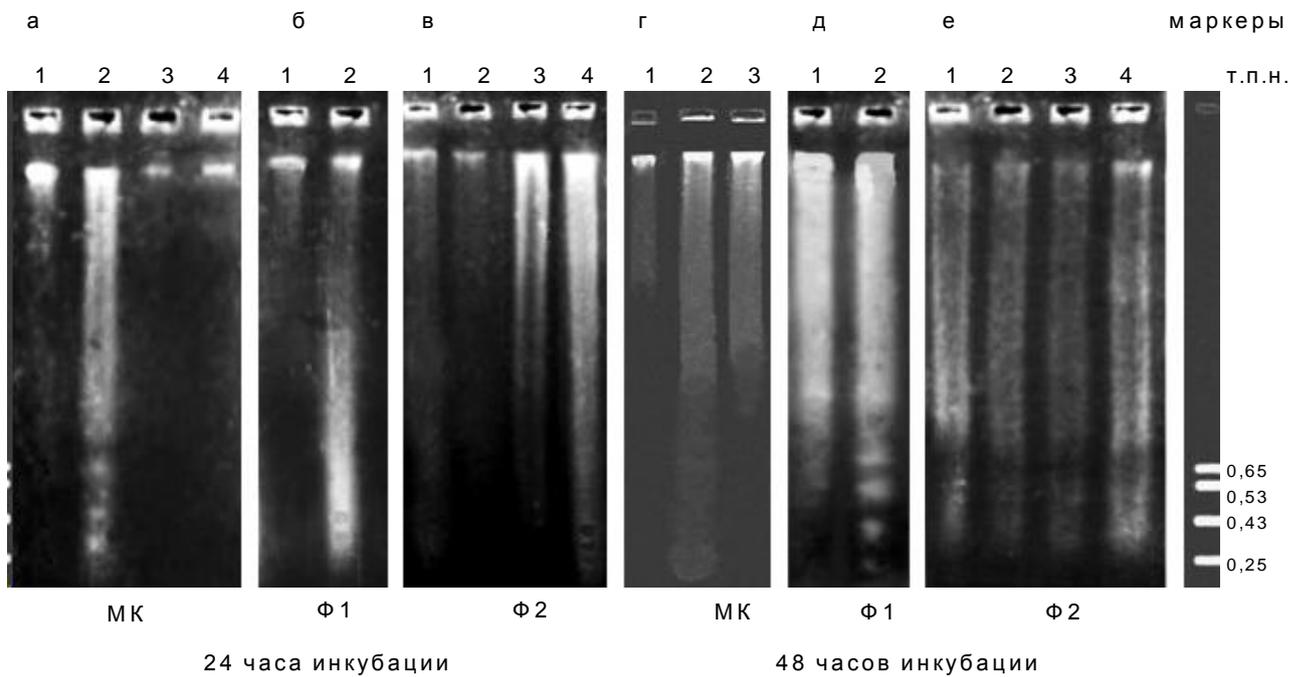


Рис. 5. Фрагментация ДНК в МК (а, г), Ф1 (б, д), Ф2 (в, е) при воздействии дексаметазона через 24 и 48 ч инкубации *in vitro*. Обозначение полос: 1 – контроль; 2 – дексаметазон, 100 мкМ; 3 – дексаметазон, 1 мкМ; 4 – дексаметазон, 0,1 мкМ.

Другие использованные концентрации дексаметазона (0,1 и 1 мкМ), однако, не только не стимулировали апоптоз в МК через 24 ч инкубации, но даже снижали его по

сравнению с контролем (рис. 5, а). Через 48 ч инкубации отмечено прямое концентрационно-зависимое апоптотическое действие дексаметазона на МК. Апоптоз в МК увеличивался с ростом концентрации дексаметазона: наиболее выраженное действие на апоптоз МК оказывала концентрация дексаметазона 100 мкМ (рис. 5, г).

В контрольных Ф1 также наблюдался низкий уровень апоптоза (рис. 3, в, г). По данным окрашивания Hoechst 33342 доля Ф1 с признаками апоптоза составила $20,4 \pm 1,2\%$ (рис. 4).

При исследовании влияния дексаметазона на Ф1 выявлено, что дексаметазон (100 мкМ), также, как и в МК, оказывал значительное проапоптотическое действие на Ф1 по сравнению с контролем (рис. 5, б). Через 48 ч инкубации апоптоз наблюдался в контроле Ф1 и при инкубации в среде с добавлением дексаметазона (100 мкМ) значительно возрастал (рис. 5, д).

При исследовании Ф2, апоптоз наблюдался в контроле через 24 ч инкубации (рис. 3, д, е, 4). При использовании дексаметазона (100 мкМ) уровень апоптоза снижался, а при концентрациях 1 и 0,1 мкМ дексаметазон вызывал возрастание уровня апоптоза в Ф2 по сравнению с контролем (рис. 5, в). Через 48 ч инкубации Ф2 признаки апоптоза наблюдались как в контроле, так и при всех исследованных концентрациях дексаметазона (100, 1, 0,1 мкМ) (рис. 5, е).

Известно, что в организме позвоночных глюкокортикоидные гормоны выступают в качестве физиологических индукторов апоптоза (Зенков и др., 1999). Апоптоз же в иммунocyтaх иглокожих малоизучен, также, как и способы его индукции. Из возможных претендентов на регуляцию апоптоза можно выделить гормоны, описанные у беспозвоночных, в том числе, у морских звезд (Ламаш, 2002). Механизм действия одного из подобных гормонов – 1-метиладенина – включает звенья, близкие к таковым глюкокортикоидных гормонов (Ламаш, 2002; Zaugg et al., 2001). Учитывая, что иммуносупрессия у позвоночных, вызываемая глюкокортикоидами, осуществляется через индукцию апоптоза, можно предполагать, что они могут влиять и на апоптоз у иглокожих.

Полученные результаты показывают, что дексаметазон, как и в иммунных клетках позвоночных, индуцирует апоптоз в целомоцитах голотурии *E. fraudatrix*. Интенсивность ответа зависела от концентрации дексаметазона и времени инкубации, и характер зависимости отличался в разных типах иммунocyтoв. Значительный

апоптотический эффект через 24 ч инкубации дексаметазон оказывал в МК и Ф1 в относительно высокой дозе (100 мкМ) по сравнению с используемыми для стимуляции апоптоза в тимоцитах позвоночных (Zaugg et al., 2001). Концентрации же 0,1-1 мкМ даже угнетали апоптоз в МК голотурии *E. fraudatrix*. В Ф2 же, напротив, дексаметазон в концентрации 100 мкМ подавлял апоптоз, а в концентрации 0,1 и 1 мкМ стимулировал. Это свидетельствует о более низкой чувствительности МК и Ф2 к иммуносупрессивным эффектам глюкокортикоидов.

Нужно отметить, что фракции иммуноцитов различались по уровню апоптоза при инкубации. Так, в Ф1 и МК, через 24 ч инкубации, наблюдался низкий уровень апоптоза, а в Ф2 в этот период зарегистрирован выраженный апоптоз. Соответственно, в клетках, с низким уровнем апоптоза (Ф1 и МК) дексаметазон оказывал через 24 ч апоптозстимулирующее действие только в концентрации 100 мкМ, однако с увеличением времени инкубации до 48 ч апоптозстимулирующее действие проявлялось и при меньшей концентрации (до 1 мкМ). Напротив, в Ф2, в которых через 24 ч инкубации зарегистрирован выраженный апоптоз, инкубация с дексаметазоном в концентрации 100 мкМ снижала уровень апоптоза. Однако через 48 ч дексаметазон во всех концентрациях оказывал проапоптотическое действие, при этом зависимость от концентрации была нелинейной.

Известно, что макрофаги позвоночных обладают высокой пластичностью в ответ на окружающие сигналы. Следствием этого является присутствие не только «агрессивных» клеток (M1), встающих на защиту организма-хозяина и отличающихся высокой продукцией АФК, но и клеток с «полярной» функцией (M2), отвечающих за процессы восстановления поврежденных тканей. При этом дексаметазон способен влиять на поляризацию макрофагов, меняя их функции (Tedesco et al., 2015). Можно предположить, что и при действии на Ф1 и Ф2 *E. fraudatrix* дексаметазон влияет на поляризацию фагоцитов, осуществляя сдвиг функций в сторону другого типа.

На иммунных клетках позвоночных показано, что процессы апоптоза могут быть связаны со стимуляцией продукции АФК и с активностью антиоксидантных ферментов в клетках. В частности, известно о защитной роли антиоксидантных ферментов в отношении дексаметазон-индуцированного апоптоза (Curi, 1998; Персиянова, Вольский, 2003). При этом показано, что экзогенная каталаза способна ингибировать процессы

апоптоза, вызванные глюкокортикоидами (Персиянова и др., 1998; Sandstrom, Buttke, 1993; Curi, 1998).

В настоящей работе выявлено, что МК менее чувствительны к дексаметазониндуцированному апоптозу, чем Ф2. На иммунocyтaх голотурии показано, что различия в уровне апоптоза между отдельными типами иммунocyтoв могут зависеть от исходного уровня оксидантно-антиоксидантного баланса (Dolmatova, Zaika, 2010). В Ф1 *E. fraudatrix* ранее также был выявлен высокий уровень активности антиоксидантных ферментов, особенно каталазы (Dolmatova et al., 2003). Возможно, что чувствительность отдельных типов иммунocyтoв голотурии к проапоптотическому эффекту дексаметазона может быть связана с различиями в их оксидантно-антиоксидантном балансе. Дальнейшие исследования были проведены с целью изучения антиоксидантного статуса клеток в процессе инкубации и воздействия дексаметазона.

Влияние экзогенной каталазы на апоптотический эффект дексаметазона и активность антиоксидантных ферментов в Ф1 голотурии *E. fraudatrix*. Исследование роли каталазы в развитии апоптоза в иммунocyтaх голотурий было проведено в серии экспериментов по инкубации Ф1 с дексаметазоном при одновременном введении коммерческого препарата каталазы (70 мкг/мл). В исследовании использовали дексаметазон в концентрации 100 мкМ.

Было установлено, что через 24 ч инкубации Ф1 с дексаметазоном каталаза отменяла его апоптотическое действие (рис. 6).

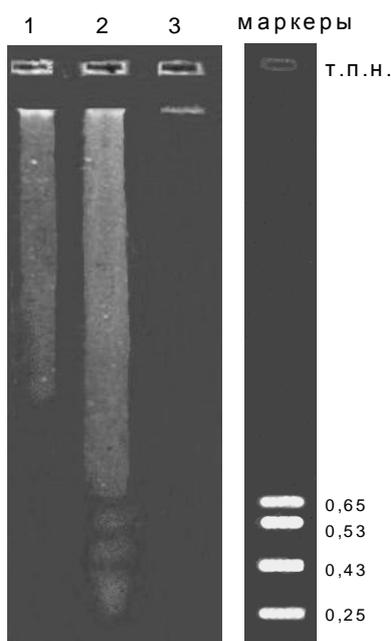


Рис. 6. Фрагментация ДНК в Ф1 при воздействии дексаметазона и каталазы через 24 ч инкубации: 1 – контроль; 2 – дексаметазон, 100 мкМ; 3 – дексаметазон, 100 мкМ + каталаза, 70 мкг/мл.

Аналогичные результаты получены на тимоцитах мышей: показано, что апоптоз этих клеток, индуцированный дексаметазоном (100 мкМ), снижался при добавлении в среду инкубации каталазы (Персиянова и др., 1998). Известно, что дексаметазон вызывает значительное увеличение продукции O_2^- (и, соответственно, возникающей в результате его дисмутации H_2O_2) в иммунных клетках, а также, что индукция дексаметазоном апоптоза иммуноцитов снимается каталазой, снижающей концентрацию H_2O_2 в клетках. По-видимому, ингибирование глюкокортикоидиндуцированного апоптоза фагоцитов голотурии *E. fraudatrix* под воздействием добавленной каталазы также связано с уменьшением продукции H_2O_2 с помощью этого фермента.

Учитывая, что ведущим механизмом антиапоптотического действия каталазы у позвоночных является «деактивация» H_2O_2 (Персиянова и др., 1998), для установления механизмов антиапоптотического действия этого фермента у голотурий была исследована также активность СОД, катализирующей реакцию, одним из продуктов которой является H_2O_2 .

Было установлено, что через 18 ч инкубации, дексаметазон вызывал рост активности СОД в Ф1 в 4,5 раза по сравнению с контролем, а при добавлении каталазы активность СОД уменьшалась до уровня контроля (рис. 7, а). При этом инкубация Ф1 только с каталазой не влияла на активность СОД по сравнению с контролем (рис. 7, а). Это свидетельствует о том, что дексаметазон, действительно, стимулирует рост АФК, и активацию СОД в первые 18 ч инкубации, что приводит к росту уровня H_2O_2 , которая инактивируется каталазой. К 24 ч инкубации Ф1 с дексаметазоном, активность СОД снижалась на 30% по сравнению с контролем. При этом добавление каталазы возвращало активность СОД к уровню контроля (рис. 7, а).

Для выяснения механизмов антиапоптотического действия каталазы в Ф1, обработанных дексаметазоном, была исследована также активность ГР (рис. 7, б). Было показано, что дексаметазон снижал активность ГР в Ф1 на 80 и 85% ($P < 0,05$) по сравнению с контролем через 24 и 48 ч инкубации, соответственно. Добавление каталазы приводило к увеличению активности ГР, которая приближалась к контрольному уровню через 48 ч инкубации. Инкубирование Ф1 с препаратом каталазы способствовало увеличению активности ГР через 24 ч на 30% по сравнению с контролем и ее снижению до уровня контрольных значений к 48 ч инкубации (рис. 7, б).

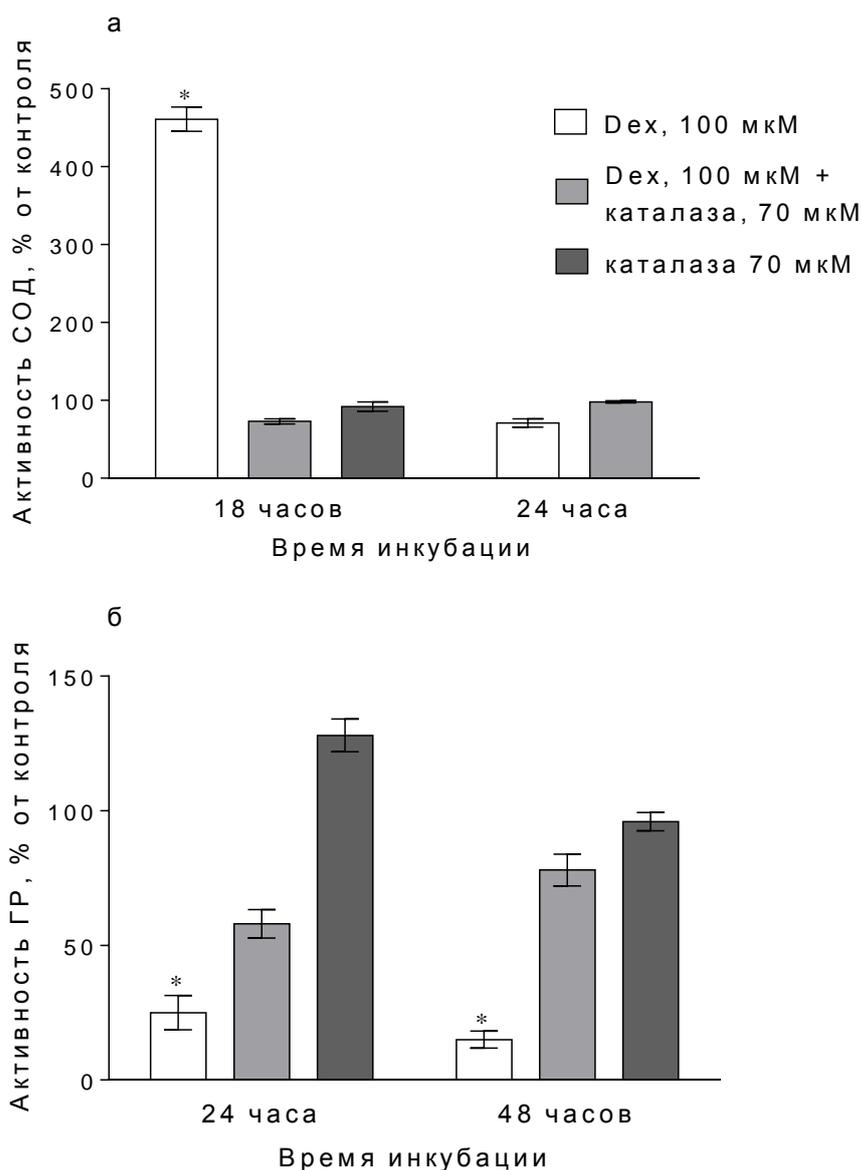


Рис. 7. Влияние коммерческого препарата каталазы на активность СОД (а) и ГР (б) при инкубации Ф1 *in vitro*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Таким образом, в фагоцитах голотурии *E. fraudatrix*, через 24 ч инкубации с дексаметазоном (100 мкМ), каталаза отменяла его апоптотическое действие. При этом нормализовались активности как СОД, так и ГР, и, по-видимому, предотвращалось увеличение продукции АФК, которые, как известно, являются медиаторами апоптоза в лейкоцитах позвоночных (Артюхов и др., 2011). Необходимо отметить, что неядерные механизмы действия дексаметазона наименее изучены (Тодосенко и др., 2017). Вследствие этого влияние дексаметазона на антиоксидантные ферменты фагоцитов было изучено более подробно.

3.1.2. Влияние дексаметазона на активность антиоксидантных ферментов Ф1. С целью подтверждения важной роли антиоксидантных ферментов в защите иммунноцитов голотурии *E. fraudatrix* от дексаметазониндуцированного апоптоза проведены исследования динамики активностей СОД, каталазы и ГР в Ф1 при инкубации с дексаметазоном.

Было показано, что через 18 ч инкубации Ф1 с дексаметазоном (1 и 100 мкМ) происходила достоверная по сравнению с контролем концентрационно-зависимая активация СОД: на 64% ($P < 0,05$) и 368% ($P < 0,001$), соответственно (рис. 8, а). К 24 ч инкубации активность СОД приближалась к контрольному уровню при всех исследованных концентрациях дексаметазона (рис. 8, а).

Активность каталазы в Ф1 через 18 ч инкубации была достоверно ниже контрольной на 49% ($P < 0,05$) при концентрации дексаметазона 100 мкМ (рис. 8, б), а к 24 ч инкубации существенно возрастала на 44% ($P < 0,001$) при концентрации дексаметазона 1 мкМ и к 48 ч инкубации в 4,7 (1 мкМ), и в 6,3 (0,1 мкМ) раз по сравнению с контролем. При концентрации дексаметазона 100 мкМ активность каталазы в Ф1 через 24 и 48 ч инкубации была на уровне контрольных значений (рис. 8, б).

Активность ГР в Ф1 под влиянием дексаметазона (100 и 0,1 мкМ) была ниже контрольной на 75 ($P < 0,05$) и 25%, соответственно, через 24 ч, и на 80 и 60% ($P < 0,05$) к 48 ч инкубации (рис. 8, в). Таким образом, через 18 ч инкубации активность СОД возрастала соответственно росту концентраций дексаметазона от 0,1 мкМ до 100 мкМ. Эти результаты позволяют предположить, что дексаметазон стимулировал рост продукции АФК в Ф1 в этот период, поскольку известно, что СОД обеспечивает превращение супероксидного анион-радикала в менее активный окислитель – перекись водорода и воду, и ее активность напрямую связана с увеличением АФК (Меньшикова и др., 1997). Уменьшение активности каталазы с ростом концентрации дексаметазона (от 1 до 100 мкМ) можно объяснить истощением фермента за счет высокого уровня H_2O_2 в этот период.

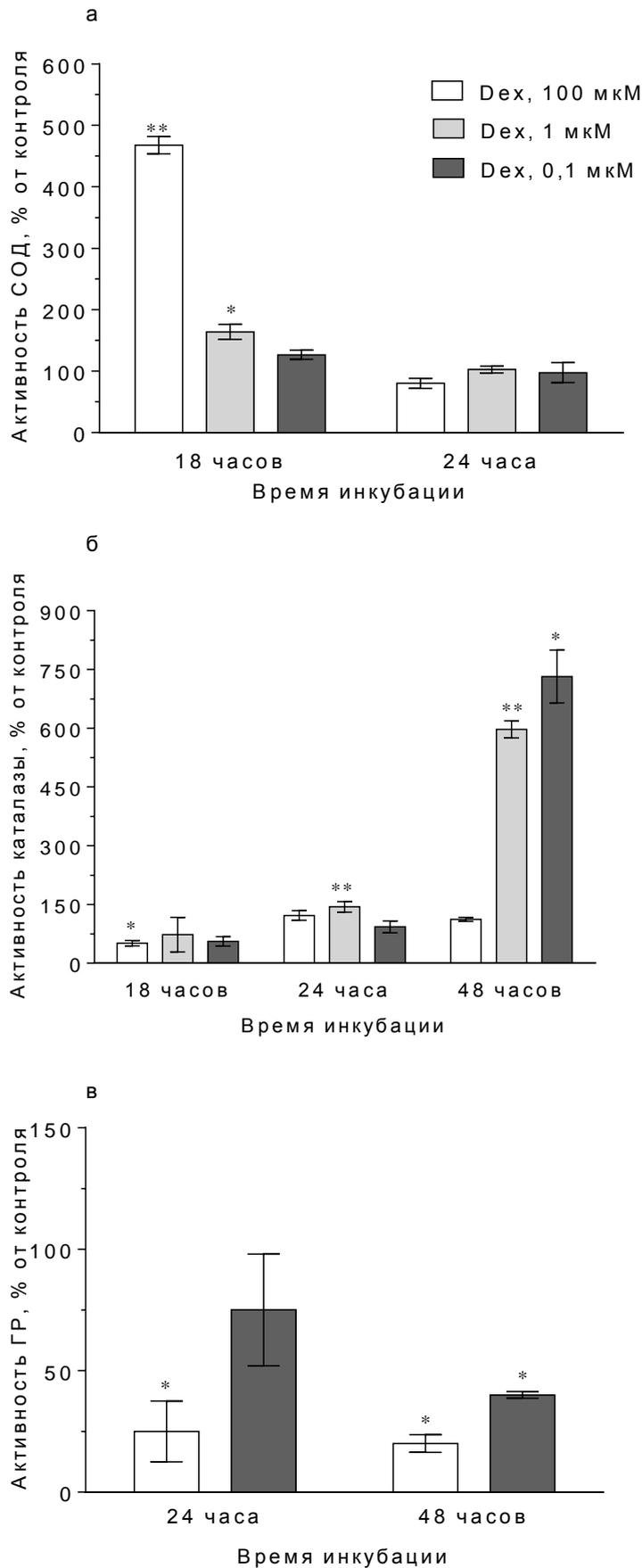


Рис. 8. Изменение активности СОД (а), каталазы (б) и ГР (в) в Ф1 при воздействии дексаметазона *in vitro*. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Как следует из приведенных результатов, через 18 ч инкубации активность СОД увеличивалась, по сравнению с контролем, прямо пропорционально концентрации дексаметазона, а активность каталазы не связана напрямую с его концентрацией. Учитывая приведенные данные (рис. 6) о защитном действии каталазы при дексаметазониндуцированном апоптозе, можно предполагать, что снижение активности фермента может играть ведущую роль в последующем развитии апоптоза через 24 ч инкубации. Через 48 ч инкубации, однако, активность каталазы была выше контрольной, возрастая обратно концентрации дексаметазона (в диапазоне 0,1-1 мкМ). Активность ГР при концентрации дексаметазона (100 и 1 мкМ) через 48 ч инкубации была снижена в большей степени, чем через 24 ч, при этом также сохранялась прямая зависимость от концентрации дексаметазона. При инкубации Ф1 с дексаметазоном в течение 24 ч, по-видимому, ведущую роль уже играло снижение уровня восстановленного глутатиона, который расходуется на инактивацию АФК, посредством реакции, в результате которой образуется окисленный глутатион (Руднева, 2003). В свою очередь окисленный глутатион, являясь токсичным, быстро конвертируется в глутатион восстановленный с помощью глутатионредуктазы (Porov et al. 2015). Таким образом, о снижении восстановленного глутатиона можно судить по снижению активности ГР в Ф1 проинкубированных 24 ч с дексаметазоном (100 мкМ). Вследствие способности восстановленного глутатиона нейтрализовывать АФК, он играет центральную роль в регуляции апоптоза во многих клетках. Аналогичные результаты получены при 24-часовой инкубации тимоцитов мышей в среде с дексаметазоном: активность ГР была значительно снижена, а содержание в них восстановленного глутатиона уменьшалось на 80% (Зенков и др., 1999).

Нужно отметить, что наиболее эффективным активатором/ингибитором указанных выше ферментов был дексаметазон в концентрации 100 мкМ, для которой был показан и наибольший апоптотический эффект. Таким образом, развитие апоптоза в Ф1 происходило на фоне первоначального роста активности СОД, с последующим ингибированием активности всех исследованных антиоксидантных ферментов к 24 ч, в том числе и ГР. Активность ГР оставалась низкой при высоких концентрациях дексаметазона по сравнению с контролем и через 48 ч инкубации, в то время как активность каталазы в этот период, напротив, возрастала (1 мкМ дексаметазона) или оставалась на уровне контроля (100 мкМ). Высокий уровень апоптоза при воздействии

100 мкМ дексаметазона свидетельствует о том, что определяющее значение в этот период (24 ч) имеет, по-видимому, не столько высокий уровень H_2O_2 , который может удаляться активированной каталазой, сколько низкий уровень восстановленного глутатиона.

Полученные данные о динамике изменений антиоксидантной ферментативной активности наряду с данными о защитной роли каталазы в развитии апоптоза свидетельствуют о том, что апоптозмодулирующее действие дексаметазона на фагоциты голотурии *E. fraudatrix* осуществляется через стимуляцию H_2O_2 . Такой механизм был показан также для некоторых иммунцитов позвоночных, в частности, тимоцитов мышей (Персиянова и др., 1998). Известно, также, что H_2O_2 активирует транскрипционный фактор NF- κ B, что приводит к индукции синтеза ряда провоспалительных цитокинов у позвоночных, в частности ИЛ-1 α (DangLi et al., 2012; Padgett et al., 2013), являющихся ведущими факторами в развитии воспаления у млекопитающих (Гусев, Черешнев, 2012). Показано, что вызвать развитие сепсиса в эксперименте может одно лишь добавление провоспалительных цитокинов (Muroya et al., 2012). Вследствие этого, противовоспалительная терапия направлена, прежде всего, на снижение уровня этих веществ. Дексаметазон эффективно ингибирует их синтез и является одним из наиболее используемых в мире противовоспалительных препаратов (Гусев, Черешнев, 2012).

У иглокожих обнаружены предковые формы ряда цитокинов позвоночных, в том числе и провоспалительных, таких как ИЛ-1 α -ПВ и рецепторы к ним (Legas et al., 1996). Поскольку цитокины участвуют в регуляции апоптоза в иммунных клетках позвоночных (Чечина и др., 2009), для изучения механизмов влияния дексаметазона на иммунноциты голотурии *E. fraudatrix* представлялось важным исследовать его действие на уровень ИЛ-1 α -ПВ в Ф2, которые наиболее чувствительны к дексаметазониндуцированному апоптозу.

Влияние дексаметазона на уровень ИЛ-1 α -подобных веществ в Ф2 голотурии *E. fraudatrix in vitro*. Проведенные исследования выявили, что инкубация Ф2 с дексаметазоном (100, 1, 0,1 мкМ) в течение 24 ч приводила к достоверному концентрационно-зависимому снижению уровня ИЛ-1 α -ПВ по сравнению с контролем (рис. 9). Наибольшее снижение уровня ИЛ-1 α -ПВ (более чем в 20 раз по сравнению с контролем) индуцировал дексаметазон в концентрации 1 мкМ (рис. 9).

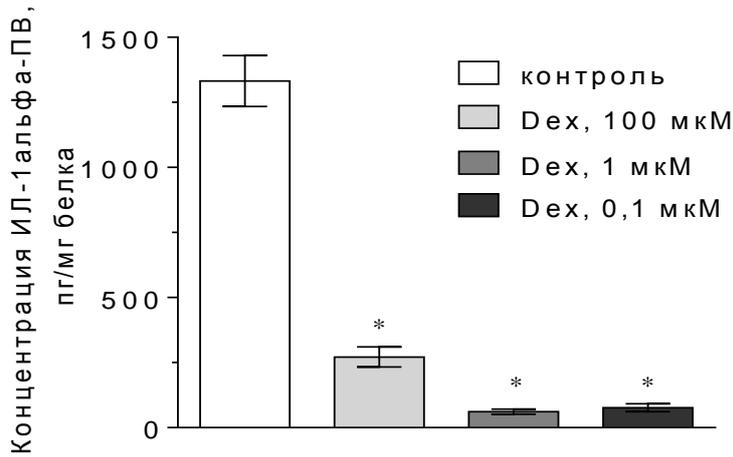


Рис. 9. Концентрация ИЛ-1α-ПВ в Ф2, проинкубированных с дексаметазоном в течение 24 ч. * $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

Эти данные соответствуют представлениям об ингибирующем действии низких концентраций дексаметазона на уровень провоспалительных цитокинов позвоночных и наличии бифазного эффекта в зависимости от концентрации препарата (Гусев, Черешнев, 2012; Chantong et al., 2012).

Как показано (рис. 5, в), дексаметазон в концентрации 100 мкМ через 24 ч инкубации с Ф2 снижал уровень апоптоза по сравнению с контролем, а в концентрациях 0,1 и 1 мкМ, напротив, его стимулировал. Сопоставление этих результатов и данных об ингибирующем влиянии дексаметазона на уровень ИЛ-1α-ПВ в Ф2 голотурий свидетельствует о том, что проапоптотическое действие дексаметазона находится в обратной зависимости от уровня ИЛ-1α-ПВ в этих клетках. По-видимому, индукция дексаметазоном апоптоза Ф2 происходит на фоне ингибирования им уровня провоспалительных цитокинов в клетке.

Полученные данные свидетельствуют также о сходстве характера влияния дексаметазона на цитокины в иммунных клетках позвоночных и цитокиноподобные вещества в фагоцитах голотурий. По-видимому, глюкокортикоидные гормоны могут оказывать иммуномодулирующий эффект на клетки голотурии по механизмам, включающим синтез цитокиноподобных веществ, аналогичных провоспалительным цитокинам позвоночных. Эти данные указывают также на эволюционную древность цитокин-опосредованных механизмов гормональной регуляции естественного иммунитета и подтверждают возможность использования фагоцитов голотурий как модельного объекта при исследовании механизмов иммунитета позвоночных.

3.2. Влияние дексаметазона на кооперационный ответ иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix in vitro*

Известно, что у позвоночных животных иммунный ответ осуществляется при взаимодействии нескольких типов иммунных клеток. Эти взаимодействия проявляются как в форме прямых клеточных контактов, так и через гуморальные продукты, такие, как цитокины (Ярилин, 1999; Nguyen, Tidball, 2002).

Для иглокожих данные о таком взаимодействии представлены единичными работами (Дьячков и др., 2006; Дьячков, Кудрявцев, 2007; Arizza et al., 2007), проведенными на морских ежах и морских звездах. У голотурий изучение возможного взаимодействия различных типов иммуноцитов и его регуляция не проводилось.

Так как в наших экспериментах обнаружено, что дексаметазон способен оказывать существенное влияние на функциональную активность отдельных типов иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix in vitro*, представлялось важным изучить возможность взаимодействия различных типов иммуноцитов и механизмы его регуляции дексаметазоном. Исследования проводились при попарном взаимодействии клеток: воздействии супернатантов одного типа клеток, преинкубированных с ФСБН или дексаметазоном, на другой тип клеток (клетки-мишени). При исследовании возможности обмена апоптотическими сигналами между отдельными типами иммуноцитов голотурии *E. fraudatrix* оценивали функциональную активность клеток по уровню их апоптоза, ИЛ-1 α -ПВ и активности антиоксидантных ферментов. Для получения супернатантов клеток, предположительно содержащих апоптозмодулирующие вещества, Ф1 и МК были преинкубированы с ФСБН или дексаметазоном в концентрации 100 мкМ в течение 3 или 24 ч.

3.2.1. Исследование взаимодействия МК и Ф1 голотурии *E. fraudatrix* и влияние на него дексаметазона

Уровень апоптоза в Ф1 и МК при их гуморальном взаимодействии и его регуляция дексаметазоном. Для исследования возможного воздействия апоптозмодулирующих продуктов из МК на Ф1 и влияния на этот процесс дексаметазона, Ф1 инкубировали с супернатантами, полученными после центрифугирования МК, преинкубированных в ФСБН или с добавлением дексаметазона

в концентрации 100 мкМ (в соответствии со схемой эксперимента, представленной на рис. 2). Контролем служили Ф1, проинкубированные 30 мин, 18 или 24 ч в ФСБН.

При 30-минутной инкубации Ф1 с супернатантом МК, преинкубированных 24 ч (сМК24), деградация ДНК значительно снижалась по сравнению с контролем (рис. 10, а).

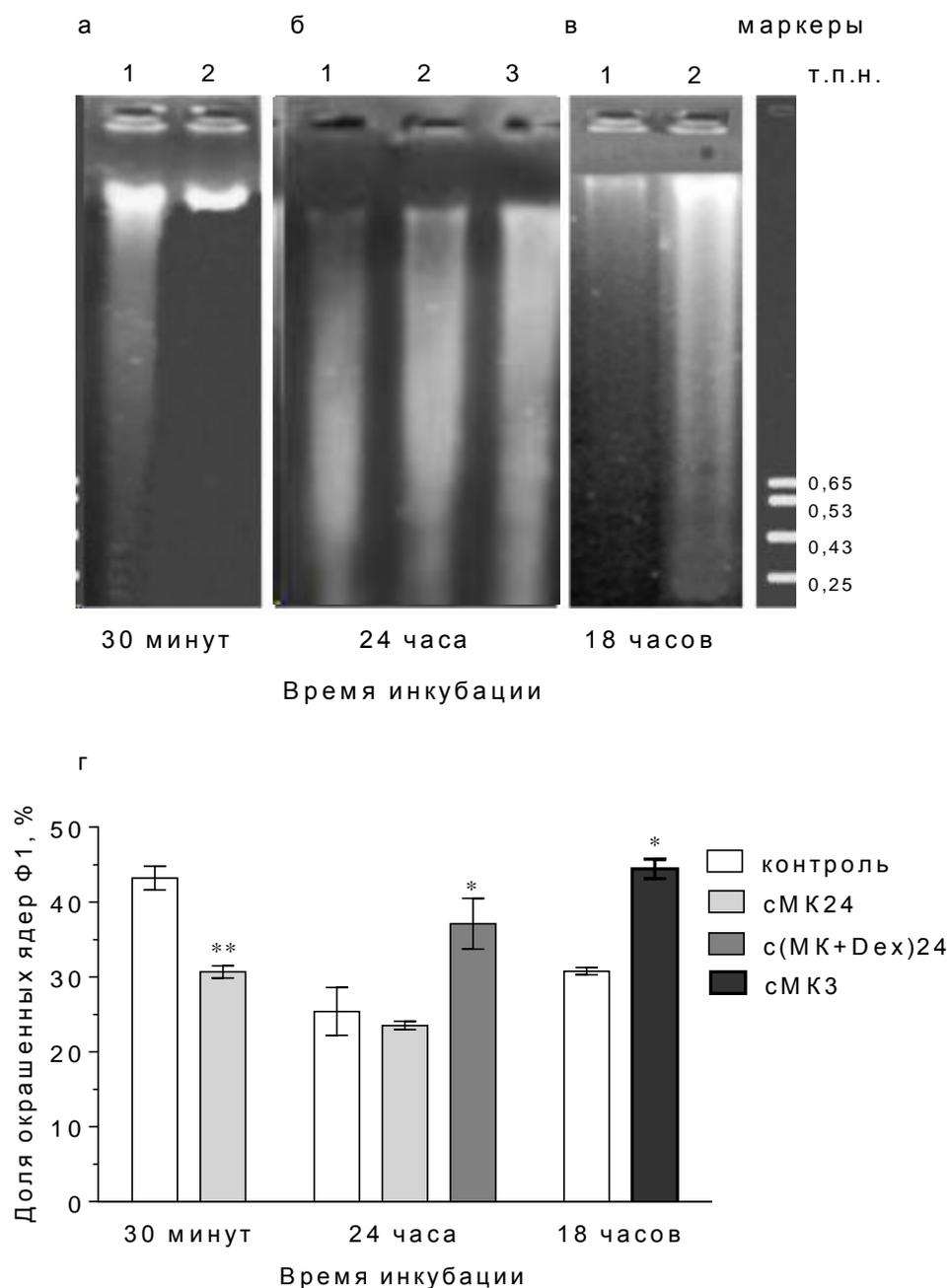


Рис. 10. Фрагментация ДНК (а-в) и доля окрашенных Hoechst 33342 ядер (г) Ф1 при воздействии супернатанта МК, преинкубированных 24 ч (а, б, г), и 3 ч (в): 1 - контроль Ф1; 2 - Ф1 + супернатант МК; 3 - Ф1 + супернатант МК, преинкубированных с дексаметазоном, 100 мкМ. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ по сравнению с контролем.

Антиапоптотическое действие сМК24 на Ф1 было подтверждено с помощью окраски Hoechst 33342: уровень апоптоза в Ф1 при воздействии сМК24 был в 1,3 раза меньше по сравнению с контролем (рис. 10, г). Инкубация в течение 24 ч с сМК24 не влияла на апоптоз по сравнению с уровнем в контрольных Ф1 (рис. 10, б, г).

Таким образом, увеличение времени инкубации с 30 мин до 24 ч Ф1 с сМК24 приводило к снижению антиапоптотического эффекта последнего. Однако, 24-часовая инкубация Ф1 с супернатантом МК, преинкубированных 24 ч с дексаметазоном (с(МК+Dex)24), приводила к увеличению апоптоза в Ф1 в 1,5 раза по сравнению с контролем (рис. 10, б, г).

Было исследовано также влияние времени преинкубации МК на эффект воздействия их супернатантов на Ф1. Если МК были преинкубированы 3 ч, добавление их супернатанта (сМК3) к Ф1 приводило к увеличению уровня апоптоза через 18 ч инкубации по сравнению с контролем (рис. 10, в, г). Таким образом, при небольшом сроке преинкубации (3 ч) МК, их супернатант оказывал на Ф1 проапоптотическое действие.

При исследовании возможного воздействия апоптозмодулирующих продуктов из Ф1 на МК и влияния на этот процесс дексаметазона, МК инкубировали с супернатантами, полученными после центрифугирования Ф1, преинкубированных в ФСБН или с добавлением дексаметазона в концентрации 100 мкМ (в соответствии со схемой эксперимента, представленной на рис. 2). Контролем являлись МК, преинкубированные 30 мин или 24 ч в ФСБН.

При 30-минутной инкубации МК с супернатантом, полученным после преинкубации Ф1 в течение 24 ч (сФ1-24), было показано снижение фрагментации ДНК по сравнению с контролем уже через 30 мин инкубации (рис. 11, а). Окраска Hoechst 33342 показала, что уровень апоптоза уменьшился в 1,5 раза по сравнению с контролем (рис. 11, в). Напротив, при 24-часовой инкубации МК с сФ1-24 уровень апоптоза возрастал в 1,9 раз по сравнению с контролем (рис. 11, б, в). Преинкубация Ф1 с дексаметазоном в течение 24 ч способствовала увеличению уровня апоптоза в МК при последующей их инкубации в течение 24 ч с супернатантом Ф1 в 2,8 раз по сравнению с контролем (рис. 11, б, в). Таким образом, с увеличением времени инкубации с клетками-мишенями, антиапоптотическое действие сФ1-24 изменялось на проапоптотическое и преинкубация Ф1 с дексаметазоном потенцировала его проапоптотическое действие.

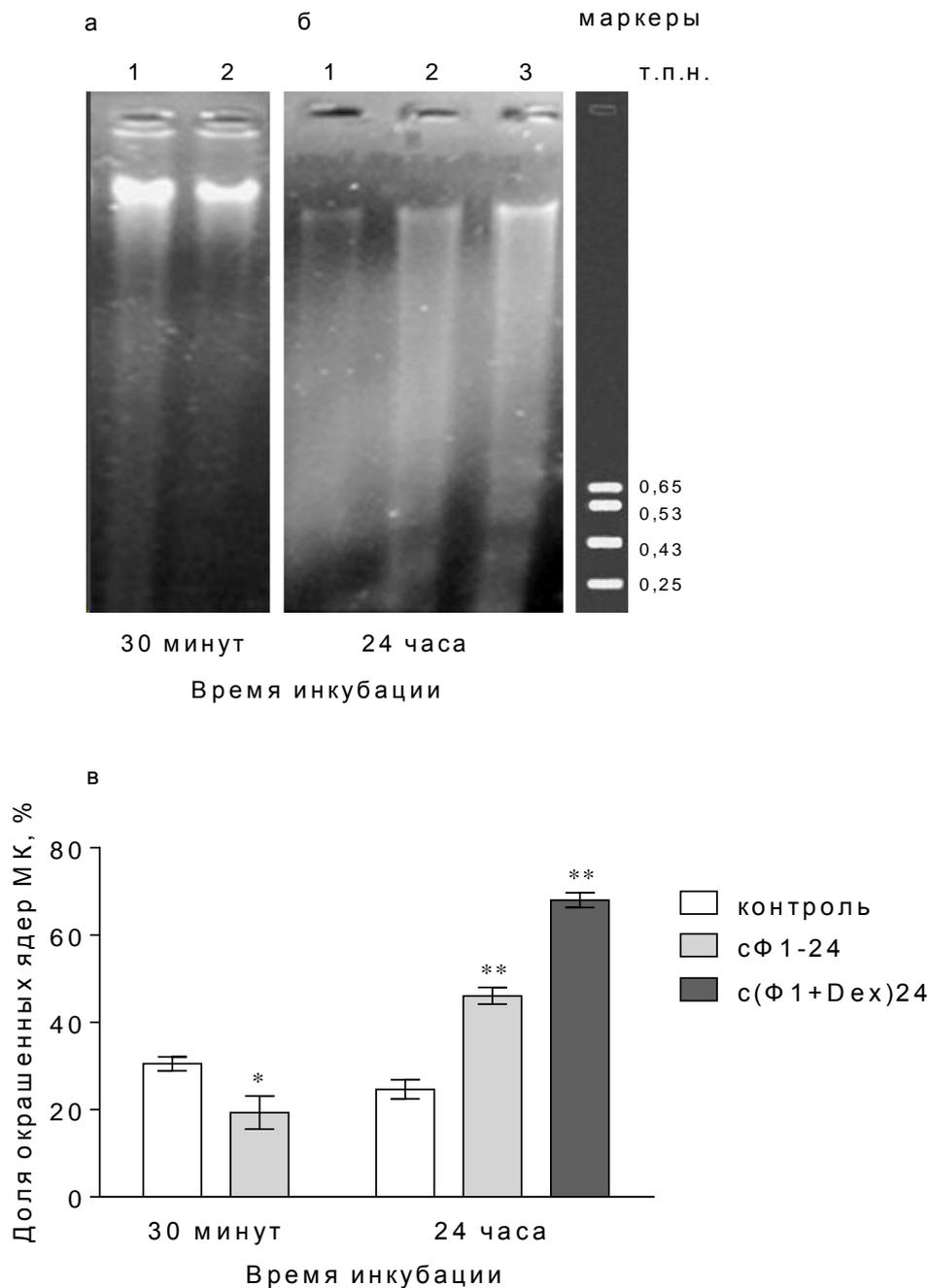


Рис. 11. Фрагментация ДНК (а, б) и доля окрашенных Hoechst 33342 ядер (в) МК при воздействии супернатанта Ф1, преинкубированных 24 ч: 1 - контроль МК; 2 - МК + супернатант Ф1; 3 – МК + супернатант Ф1, преинкубированных с дексаметазоном, 100 мкМ. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Проведенные исследования показали, что сМК24 снижал апоптоз в Ф1, и эффект зависел от длительности инкубации: к 24 ч антиапоптотическое воздействие супернатанта МК снижалось. Кроме того, эффекты супернатанта МК, зависели от времени их преинкубации: супернатант МК, преинкубированных 3 ч, в отличие сМК24, даже оказывал проапоптотическое действие на Ф1. Принимая во внимание факт, что

апоптоз в МК наиболее выражен через 30 мин инкубации и ослабевает к 24 ч (рис. 11), можно предположить, что МК выделяют в процессе инкубации вещества, оказывающие про- или антиапоптотическое действие на Ф1, в соответствии с уровнем собственного апоптоза.

По-видимому, снижение уровня апоптоза в МК к 24 ч преинкубации сопровождалось накоплением антиапоптотических продуктов в сМК, которые могли оказывать антиапоптотическое влияние на Ф1. Высокий уровень апоптоза в ранний срок преинкубации (3 ч) сопровождался накоплением проапоптотических продуктов в МК, в результате чего их супернатант оказывает на Ф1 проапоптотический эффект. Преинкубация МК с дексаметазоном (100 мкМ) приводила к тому, что их супернатант вызывал в Ф1 выраженный апоптоз. Выявленный апоптозстимулирующий эффект с(МК+Dex)24 в Ф1 подтверждает предположение о том, что эффект воздействия супернатанта МК на Ф1 соотносится с уровнем апоптоза в самих МК, поскольку показано, что 24-часовая инкубация МК с дексаметазоном усиливает апоптотические процессы в этих клетках. Такой эффект дексаметазона на иммунные клетки голотурий соответствует результатам многочисленных исследований на позвоночных, в которых был показан апоптозстимулирующий эффект глюкокортикоидных гормонов на иммунные клетки, в частности, лимфоциты (Herold et al., 2006) и макрофаги (Zen et al., 2011).

Антиапоптотический эффект супернатанта Ф1 на МК проявляется в зависимости от времени инкубации с клетками-мишенями, сменяясь даже на проапоптотический к 24 ч инкубации. Эффект также зависел от концентрации гуморальных продуктов из Ф1, так как апоптоз в МК увеличивался при воздействии на них супернатантов Ф1, в которых уровень апоптоза был повышен в результате их преинкубации с дексаметазоном. Учитывая тот факт, что при 24-часовой инкубации в МК снижался уровень апоптоза по сравнению с 30-минутной инкубацией, можно заключить, что апоптозмодулирующий эффект сФ1-24 на МК зависел от уровня апоптоза в последних. По-видимому, гуморальные вещества из Ф1 могут регулировать апоптоз в МК, и эффект этих веществ зависит от уровня апоптоза в клетках-мишенях.

Механизм такого влияния супернатантов МК и Ф1 на уровень апоптоза в клетках-мишенях не ясен, но, по-видимому, является сложным и многофакторным, как большинство апоптозмодулирующих механизмов (Широкова, 2007). Известно, что один

из ключевых механизмов развития апоптоза при стрессе связан с активацией транскрипционного фактора p53 (Blagosklonny, 2002), через рост продукции АФК (Bragado et al., 2007). Кроме того, p53 может как стимулировать экспрессию апоптозных генов, так и участвовать в подавлении экспрессии антиапоптозных генов (Широкова, 2007). Однако в последнее время появились данные о том, что p53 может оказывать и антиапоптотическое действие по механизму обратной связи (Yang et al., 2012). Представляется вероятным, что в на фоне высокого уровня апоптоза в Ф1 гуморальные вещества из МК, содержащие проапоптотические вещества, «включают», по механизму обратной связи, подобный антиапоптотический механизм действия, а при значениях апоптоза, близких к исходным, индуцируют его проапоптотическое действие.

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).

Учитывая, что максимальная активация апоптоза в Ф1 и МК приходилась на первые часы инкубации, возможно предположить, что гуморальные продукты из МК, преинкубированных 3 ч, стимулируют функциональную активность Ф1. В свою очередь, учитывая, что в самих МК через 24 ч преинкубации накапливались антиапоптотические продукты, воздействие сМК24 могло снижать функциональную активность Ф1 через 24 ч инкубации. По-видимому, Ф1 и МК могут взаимодействовать через гуморальные продукты, при этом МК способны стимулировать функциональную активность Ф1 в первые часы взаимодействия с ними, а затем, напротив, ингибировать.

Таким образом, Ф1 и МК могут на уровне гуморальных продуктов регулировать функциональную активность друг друга, ограничивая или стимулируя развитие апоптоза, по-видимому, по механизму обратной связи.

Недостаточная изученность роли отдельных типов клеток в иммунном ответе у голотурий не позволяет однозначно судить о физиологических причинах необходимости такого ограничения. Существует представление о том, что морулоподобные клетки могут выполнять функции, аналогичные таковым тучных клеток позвоночных (Chia, Xing, 1996). Также известно, что при воздействии факторов, снижающих апоптоз, происходит стимуляция активности тучных клеток (высвобождение гистамина) (Torres et al., 2012). Учитывая эти факты, можно предположить, что апоптозстимулирующий

эффект сФ1-24 на МК сопровождается снижением функциональной активности этих клеток. С другой стороны, МК могут стимулировать функциональную активность Ф1 в ранний период инкубации (3-18 ч), что сопровождается развитием апоптоза. Позднее, через 24 ч, эффекты обоих типов клеток направлены на ограничение функциональной активности друг друга. Такое взаимодействие подтверждает наличие кооперации двух типов клеток на уровне гуморальных веществ. Примерами такого взаимодействия у позвоночных являются доказанное влияние (непосредственное) тучных клеток на пролиферацию и дифференцировку Т-лимфоцитов *in vitro* (Nakano et al., 2009), а также вариант опосредованных отношений, когда тучные клетки продуцируют медиаторы, обеспечивающие адгезию Т-лимфоцитов к фибробластам (Meng et al., 1995). Однако и Т-лимфоциты также оказывают влияние на тучные клетки, в том числе, путем инициации синтеза цитокинов тучными клетками (Bhattacharjee et al., 2012).

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), то для беспозвоночных таких данных нет, и описана лишь «компартиментализация» их цитотоксичных иммунных эффекторов в полости тела (Siva-Jothy, 2006). Таким образом, представленные нами данные, впервые показывают возможность взаиморегулирующего взаимодействия иммуноцитов беспозвоночных, в частности голотурий, результат, которого зависит от времени взаимодействия.

С точки зрения «целесообразности» такого взаимодействия в паре Ф1 – МК представляется вероятным, что оба типа клеток способны стимулировать функциональную активность друг друга на ранней стадии иммунного ответа, а на более поздней либо не влиять, либо снижать функциональную активность клеток другого типа, что обеспечивает адекватность иммунного ответа без повреждения окружающих клеток и тканей АФК, продукция которых тесно связана с функциональной активностью фагоцитов, или цитотоксическими веществами, выделяемыми МК в процессе их активации. Таким образом, взаимодействия такого рода обеспечивают стабильность и безопасность работы иммунной системы.

Кроме того, полученные данные указывают, что апоптоз в МК и Ф1 у голотурии может регулироваться глюкокортикоидами, подобно иммунным клеткам позвоночных, и проапоптотические сигналы, индуцированные дексаметазоном, могут передаваться от

МК к Ф1 и наоборот. Kraaij et al. (2011) показали, что дексаметазон может увеличивать способность макрофагов крыс продуцировать АФК, что ведет к подавлению ответа Т-клеток АФК-зависимым образом. Сходным образом, в настоящей работе стимуляция Ф1 дексаметазоном, по-видимому, могла приводить к супрессии МК. Принимая во внимание факт, что у голотурий найдены лимфоцитоподобные клетки (Елисейкина, Магарламов, 2002), можно предположить, что дексаметазон может индуцировать общий иммуносупрессивный ответ путем стимуляции продукции АФК в Ф1 голотурий. Возможно, апоптозстимулирующий эффект дексаметазона в Ф1, связан со стимуляцией функциональной активности фагоцитов и увеличением продукции АФК, которые и могут быть медиаторами влияния Ф1 на другие клетки.

В МК апоптозмодулирующий эффект дексаметазона, в отличие от Ф1, по-видимому, осуществляется через другие механизмы. Известно, что у позвоночных животных важную роль в гуморальном взаимодействии иммунных клеток, а также в механизмах влияния дексаметазона, играют цитокины (Nguyen, Tidball, 2002; Schmidt et al., 2004). Ранее была выявлена относительно высокая концентрация ИЛ-1 α -ПВ в целомацитах голотурии *E. fraudatrix* (Dolmatova et al., 2008). Однако данные об участии цитокиноподобных веществ в гуморальном взаимодействии иммуноцитов иглокожих, в частности голотурий, практически отсутствуют. В связи с этим представляется важным выявить роль ИЛ-1 α -ПВ при взаимодействии иммуноцитов у голотурии. В связи с этим, были исследованы изменения в уровне ИЛ-1 α -ПВ при взаимодействии Ф1 и МК.

Уровень ИЛ-1 α -подобных веществ в Ф1 и МК при их гуморальном взаимодействии и его регуляция дексаметазоном. Проведенные исследования выявили, что оба типа клеток синтезируют ИЛ-1 α -ПВ, и их уровень значительно возрастал в процессе 24-часовой инкубации контрольных клеток: в 1,7 раза в Ф1 (рис. 12, а) и в 1,3 раза в МК (рис. 12, б). При добавлении сМК24 к Ф1 через 30 мин инкубации уровень ИЛ-1 α -ПВ в Ф1 увеличивался в 2 раза по сравнению с контролем, а через 24 ч инкубации, напротив, снижался в 2,2 раза (рис. 12, а). При преинкубации МК с дексаметазоном (100 мкМ) их супернатант способствовал удержанию уровня ИЛ-1 α -ПВ в Ф1 в пределах контрольных значений через 30 мин инкубации, и значительному снижению через 24 ч инкубации по сравнению с действием одного сМК24 (рис. 12, а).

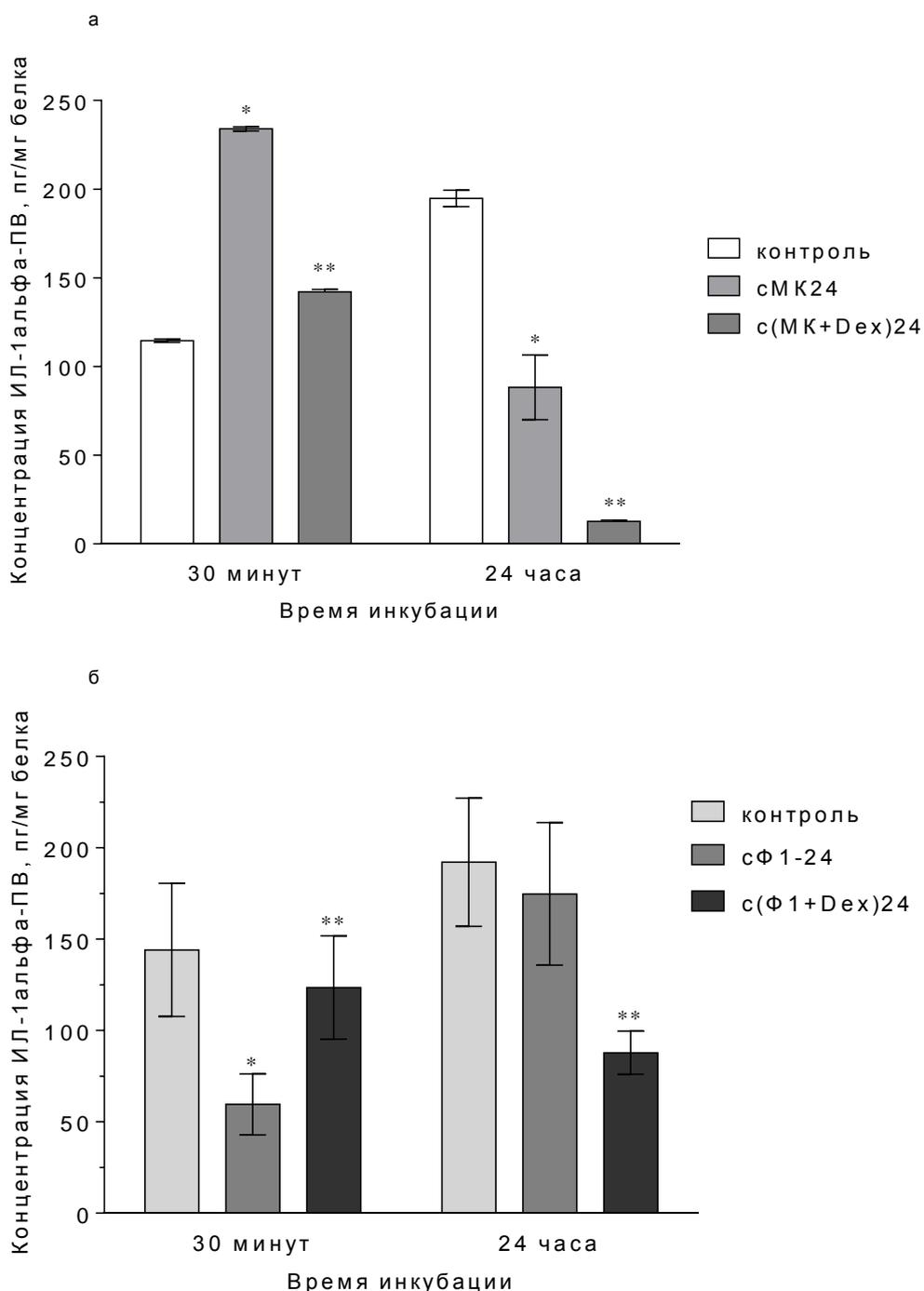


Рис. 12. Концентрация ИЛ-1 α -ПВ в Ф1 (а), проинкубированных с супернатантом МК и в МК (б), проинкубированных с супернатантом Ф1. * $P < 0,05$ по сравнению с контролем, ** $P < 0,05$ по сравнению с Ф1 + супернатант МК, преинкубированных 24 часа (а) или с МК + супернатант Ф1, преинкубированных 24 часа (б).

Инкубация МК с сФ1-24 в течение 30 мин приводила к снижению уровня ИЛ-1 α -ПВ в 2,4 раза по сравнению с контролем (рис. 12, б). Если же МК были проинкубированы 30 мин с с(Ф1+Dex)24, уровень ИЛ-1 α -ПВ сохранялся в пределах контрольного значения. При 24-часовой инкубации МК с с(Ф1+Dex)24 наблюдалось

снижение концентрации ИЛ-1 α -ПВ в 2,2 раза по сравнению с контролем (рис. 12, б). В доступной литературе сведений о регуляции синтеза цитокиноподобных веществ в отдельных типах целоцитов иглокожих не встречалось, однако есть данные о том, что морулярные клетки являются основным продуцентом ИЛ-1 α -ПВ среди целоцитов асцидий (Ballarin et al., 2001). Полученные нами данные, свидетельствуют об отсутствии существенной разницы в уровне ИЛ-1 α -ПВ в исследуемых клетках голотурии *E. fraudatrix*, а 24-часовая инкубация стимулирует повышение уровней этих веществ в обоих типах клеток.

Сопоставление периодов роста уровня ИЛ-1 α -ПВ в Ф1 при воздействии сМК24 через 30 мин инкубации, так же как и его снижения через 24 ч, с изменениями уровня апоптоза (рис. 10), указывают на то, что ИЛ-1 α -ПВ голотурий, по-видимому, являются антиапоптотическими медиаторами при взаимодействии МК и Ф1, аналогично ИЛ-1 α позвоночных (McAllister et al., 2012). Важную роль ИЛ-1 α -ПВ в защите фагоцитов от апоптоза подтверждают результаты по влиянию на Ф1 с(МК+Dex)24: с(МК+Dex)24 способствовал еще большему снижению концентрации ИЛ-1 α -ПВ. Кроме того, значительное снижение уровня ИЛ-1 α -ПВ в Ф1 при воздействии с(МК+Dex)24 соответствует известным данным о супрессивном эффекте дексаметазона на синтез ИЛ-1 α в иммунocyтах позвоночных (Schmidt et al., 2004).

Напротив, динамика изменений уровней ИЛ-1 α -ПВ и апоптоза в МК (рис. 11) при действии сФ1-24 указывает на отсутствие корреляции между ними. По-видимому, ИЛ-1 α -ПВ не играют ведущую роль в передаче апоптотического сигнала от Ф1 к МК. Однако, их важная апоптозмодулирующая роль сохранялась в экспериментах с с(Ф1+Dex)24, что свидетельствует о различиях в сигнальных механизмах гуморальных продуктов клеток под влиянием дексаметазона.

Таким образом, полученные данные об уровнях ИЛ-1 α -ПВ и апоптоза в Ф1 и МК при их гуморальном взаимодействии и его регуляции дексаметазоном, свидетельствуют о разных механизмах влияния этих клеток и может быть обусловлено различиями их функций. Наличие различных путей регуляции апоптоза известны у позвоночных: нейтрофилы отвечают на сигналы, проапоптотические для других лейкоцитов, противоположным образом (Anderson, Singh, 2017). Более того, нейтрофилы и мононуклеарные клетки по-разному реагируют на различные стрессовые стимулы на уровне изменений в антиоксидантной ферментной системе клеток (Alabdullah et al.,

2015; Малышева и др., 2007; Sagar et al., 2017). Предполагается, что это обеспечивает их взаимодействие при иммунном ответе.

В настоящей работе показано, что медиаторами эффектов МК на Ф1, по-видимому, являются ИЛ-1 α -ПВ, а Ф1 (сФ1-24), вероятно, влияет на МК через какие-то другие молекулы, например АФК, генерируемые этими клетками. Было показано, что уровень АФК в Ф1 значительно выше, чем в МК (Долматова и др., 2004). АФК обладают не только цитотоксическими свойствами, они также являются вторичными посредниками, играя роль в регуляции баланса внутриклеточных восстановительных систем, активности протеинкиназ и регуляции клеточной активности, такой как пролиферация, дифференцировка и апоптоз (Corcoran, Cotter, 2013). В то же время, имеются многочисленные данные о ключевой роли H₂O₂ в дексаметазониндуцированном апоптозе (Nie et al., 2019).

В то же время, как было показано выше, наиболее эффективная индукция апоптоза в фагоцитах голотурии *E. fraudatrix* при воздействии дексаметазоном наблюдалось при ингибировании антиоксидантных ферментов, таких как СОД и каталаза (рис. 8). Кроме того, экзогенная каталаза снижала уровень апоптоза в фагоцитах, обработанных дексаметазоном (100 мкМ) через 24 ч инкубации (рис. 6). Эти данные, наряду с данными литературы о роли АФК в развитии апоптоза (Corcoran, Cotter, 2013), дают основание предполагать, что различный уровень апоптоза в клетках может быть связан с разным уровнем их оксидантно-антиоксидантного баланса (Долматова и др., 2004), и АФК могут быть сигнальными молекулами Ф1 при взаимодействии с другими клетками.

Активность антиоксидантных ферментов в Ф1 и МК при их гуморальном взаимодействии и его регуляция дексаметазоном. Для выяснения роли изменений оксидантно-антиоксидантного баланса в развитии апоптоза в Ф1 и МК было проведено исследование изменения активности каталазы, ГР и ГТ при взаимодействии этих клеток.

Инкубация Ф1 с сМКЗ в течение 30 мин и 18 ч сопровождалась снижением активности каталазы на 13% и достоверно на 63% (P<0,001) от контроля, соответственно (рис. 13, а).

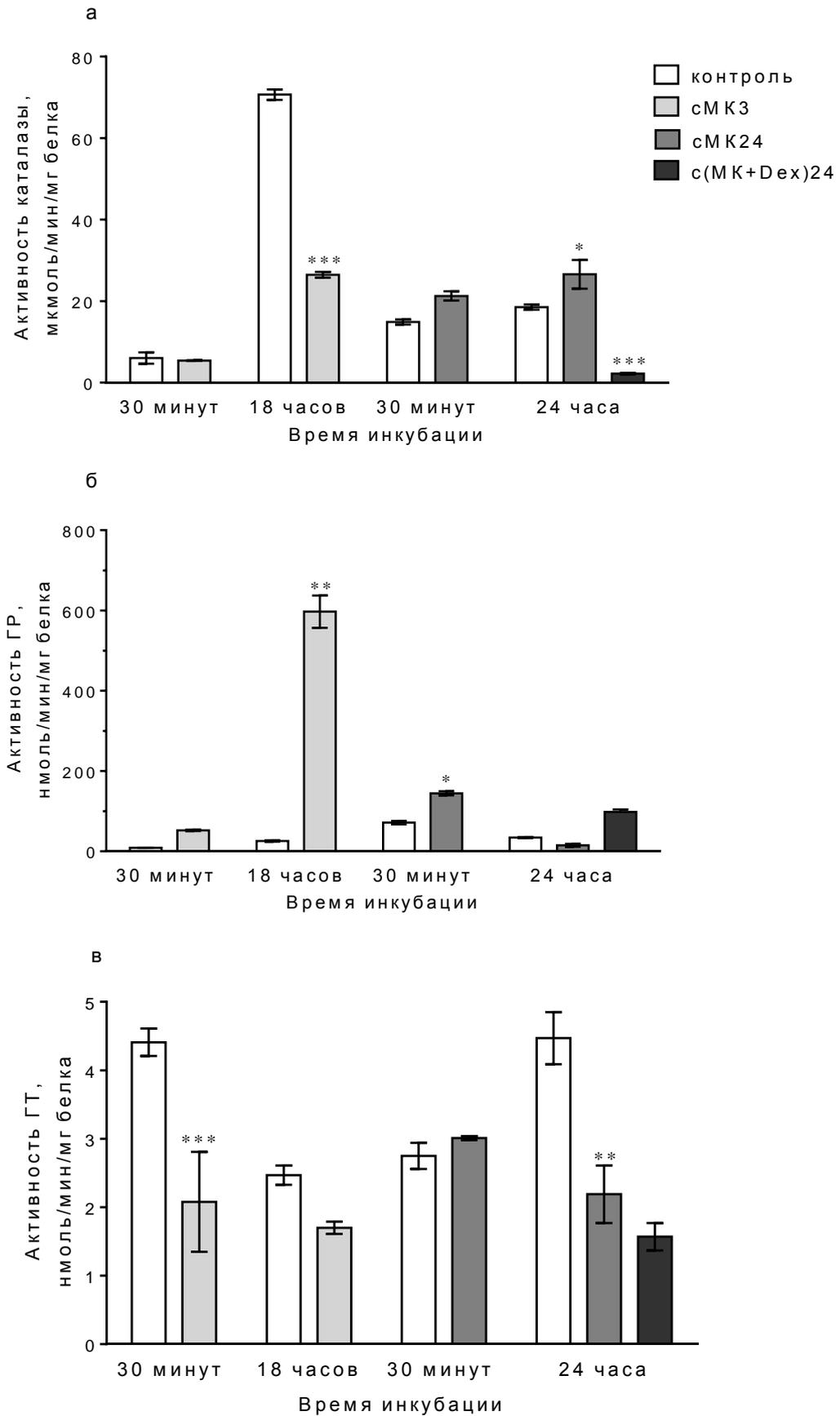


Рис. 13. Изменение активности каталазы (а), ГР (б) и ГТ (в) в Ф1 при инкубации с супернатантом МК. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Инкубация Ф1 с сМК24 в течение 30 мин приводила к увеличению активности каталазы в 1,5 раза по сравнению с контролем. При 24-часовой инкубации Ф1 с сМК24 активность фермента также была повышена в 1,4 раза по сравнению с контролем. Активность каталазы в Ф1, проинкубированных 24 ч с с(МК+Dex)24, снижалась на 88% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем (рис. 13, а).

Исследование активности ГР в Ф1, проинкубированных с сМК3 в течение 30 мин и 18 ч, показало, что она увеличилась в 6 и 23 раза по сравнению с контролем, соответственно (рис. 13, б). При 30-минутной инкубации Ф1 с сМК24 наблюдалось увеличение активности ГР - в 2 раза, а с увеличением времени инкубации до 24 часов - снижалась в 2,3 раза по сравнению с контролем (рис. 13, б). Добавление в среду предварительной инкубации МК дексаметазона (100 мкМ) вызывало рост активности ГР в Ф1, проинкубированных с с(МК+Dex)24, в 2,8 раз по сравнению с контролем (рис. 13, б).

Инкубация Ф1 в течение 30 мин и 18 ч с сМК3 приводила к снижению активности другого глутатионзависимого фермента - ГТ на 52% ($P < 0,001$) и 32% по сравнению с контролем, соответственно (рис. 13, в). Инкубация в течение 30 мин Ф1 с сМК24 не влияла на активность ГТ, а при инкубации в течение 24 ч с сМК24 или с(МК+Dex)24 в течение 24 ч, активность ГТ уменьшалась на 51% ($P < 0,01$) и 64% по сравнению с контролем, соответственно.

Таким образом, выявлены изменения в активности всех исследованных антиоксидантных ферментов, причем действие продуктов из МК зависело как от времени преинкубации МК, так и от времени инкубации супернатанта МК с Ф1. Так, с увеличением времени преинкубации МК с 3 до 24 ч снижение активности каталазы в Ф1, обработанных супернатантом МК, сменялось ее ростом относительно контроля. По-видимому, снижение активности каталазы в Ф1 во время инкубации с сМК3 связано с ингибирующим действием присутствующих в сМК3 гуморальных веществ, продуцированных в МК во время инкубации. МК не обладают способностью к респираторному взрыву, но являются продуцентами ИЛ-1 α -ПВ, повышение уровня которых в Ф1 отмечено в первые 30 мин воздействия гуморальных продуктов из МК, преинкубированных в течение 24 ч (рис. 12, а).

На возможность опосредованного воздействия цитокиноподобных веществ из МК на активность антиоксидантных ферментов в фагоцитах указывают и данные работы

Ballarin et al. (2001), показавших, что морулярные клетки асцидий (хордовые) через синтезируемые ими цитокиноподобные вещества стимулировали респираторный взрыв в фагоцитах. Учитывая эти факты, можно предположить, что одними из гуморальных продуктов, модулирующих активность каталазы в Ф1, могут быть ИЛ-1 α -ПВ. Линейный характер зависимости активности фермента от времени инкубации, и достижение значимых изменений активности при увеличении времени инкубации Ф1 с гуморальными продуктами из МК до 24 ч, указывает на то, что действие этих веществ в Ф1 осуществлялось, по-видимому, по аналогии с действием ИЛ-1 α у позвоночных, через индукцию ядерных факторов, поскольку осуществление ядерных эффектов требует достаточно длительного времени (Giavarotti et al., 2013). При этом разница в действии сМК3 и сМК24 на активность каталазы в Ф1 может быть связана с различным уровнем ИЛ-1 α -ПВ в супернатантах, полученных в разные сроки преинкубации МК, поскольку известно, что эффект действия цитокинов зависит от их концентрации (Чечина и др., 2009). Сопоставление данных о развитии апоптоза в Ф1 при воздействии сМК3 (рис. 10, в) и, напротив, снижении, при воздействии сМК24 (рис. 10, б) свидетельствуют о том, что изменения активности каталазы в Ф1, соответствуют представлениям о защитной роли этого фермента в процессе апоптоза.

В пользу этого предположения свидетельствуют и данные о том, что преинкубация МК с дексаметазоном приводила к значительному снижению активности каталазы в Ф1 при 24 ч воздействии с(МК+Dex)24. При тех же условиях эксперимента, с(МК+Dex)24 стимулировал апоптоз в Ф1 (рис. 10). Развитие апоптоза в фагоцитах происходило на фоне снижения активности каталазы, как это показано и для позвоночных (Долматова и др., 2010). Снижение активности каталазы в Ф1 происходило, по-видимому, под влиянием апоптозстимулирующих продуктов из МК, в том числе, при обработке последних дексаметазоном. Известно, что дексаметазон модулирует синтез цитокинов в клетках (Гусев, Черешнев, 2012), и H₂O₂ играет ключевую роль в передаче индуцированного дексаметазоном апоптотического сигнала (Jaramillo et al., 2009; Nie et al., 2019). По-видимому, и в настоящей работе преинкубация МК с дексаметазоном, через изменения в синтезе цитокинов в этих клетках, приводила к стимуляции синтеза H₂O₂ в Ф1 на фоне снижения активности каталазы.

Активность другого антиоксидантного фермента – ГР - напрямую зависела от времени инкубации Ф1 с сМК3: значительно возрастала в Ф1 как через 30 мин, так и –

18 ч инкубации с сМКЗ. По-видимому, рост активности ГР, на фоне снижения активности каталазы, связан с повышением продукции АФК в Ф1 под влиянием гуморальных продуктов из МК и расходом восстановленного глутатиона, на восполнение которого и направлена работа фермента, субстратом для которого является окисленный глутатион (Меньшикова и др., 2006). Это свидетельствует в пользу того, что снижение активности каталазы было определяющим для изменения активности других антиоксидантных ферментов. Однако, с увеличением времени преинкубации МК до 24 ч, направленность изменений в Ф1 при воздействии супернатанта МК менялась: при 30-минутной инкубации с сМК24 активность ГР возрастала, при 24-часовой инкубации, напротив, снижалась. Можно предположить, что такие изменения активности фермента связаны со снижением расхода восстановленного глутатиона при воздействии гуморальных продуктов из сМК24 в течение 24-часового срока инкубации, по-видимому, за счет активации каталазы. При добавлении же к Ф1 с(МК+Dex)24 активность фермента возрастала по сравнению с контролем, что, сходным образом, находит объяснение в снижении уровня восстановленного глутатиона на фоне снижения активности каталазы.

Активность ГТ при инкубации Ф1 с сМКЗ в течение 30 мин или 18 ч значительно снижалась, что также указывает в пользу предположения о росте уровня АФК и снижении уровня восстановленного глутатитона в Ф1 при воздействии гуморальных продуктов из МК. Однако через 30 мин инкубации Ф1 с сМК24, активность ГТ практически не изменялась, а через 24 ч – достоверно снижалась, по-видимому, в связи со значительным снижением уровня АФК в результате активации каталазы и переходе клетки на другой уровень оксидантно-антиоксидантного баланса. При воздействии же с(МК+Dex)24 активность ГТ снижалась еще больше, что коррелировало со снижением активности каталазы, по-видимому, уже за счет роста уровня АФК.

Полученные результаты, указывают на способность гуморальных продуктов из МК, влиять на антиоксидантную ферментную систему фагоцитов. При этом, снижение активности каталазы и ГТ и рост активности ГР, которое происходило уже через 30 мин инкубации и в дальнейшем находилось в прямой зависимости от времени инкубации Ф1 с сМКЗ (за исключением ГТ), свидетельствует о росте уровня АФК, по-видимому, в результате «респираторного взрыва» и роста функциональной активности фагоцитов. Напротив, рост активности каталазы и снижение активности ГР при воздействии сМК24

с возрастанием времени инкубации до 24 ч указывает на снижение функциональной активности Ф1, сопровождающимся снижением в них продукции АФК. Вариации активности ГТ, как и ГР, свидетельствовали о том, что изменения уровня восстановленного глутатиона связаны с изменениями уровня АФК в Ф1, при этом отсутствие прямой корреляции между активностью ГТ и каталазы в некоторые периоды инкубации свидетельствует о том, что активность ГТ зависела от уровня не только АФК, но и, по-видимому, других метаболитов (перекисных продуктов). При этом процесс влияния МК на Ф1 может модулироваться дексаметазоном, преинкубация МК с которым вызывает обратный эффект на активность антиоксидантных ферментов - каталазы и ГР. Поскольку известно, что перекись водорода играет важную роль в развитии апоптоза в клетках позвоночных (Плетюшкина и др., 2006), установленная в настоящей работе зависимость между активностью каталазы и глутатионзависимых ферментов при воздействии сМКЗ на Ф1 соответствует представлениям о ведущей роли АФК в развитии апоптоза.

Поскольку именно при инкубации с сМКЗ в Ф1 возрастала активность ГР, снижение активности ГТ в этих экспериментах, по-видимому, связано со снижением уровня восстановленного глутатиона, являющегося кофактором для ГТ (Purov et al., 2015). При этом увеличение времени предварительной инкубации МК до 24 ч отменяло ингибирующий эффект гуморальных продуктов из МК на активность ГТ в Ф1 в ранний срок инкубации (30 мин), но подавляло активность фермента через 24 ч инкубации. По-видимому, развитие апоптоза в Ф1 через 30 мин инкубации происходит при воздействии именно апоптозмодулирующих продуктов из МК, которые снижают активность каталазы и индуцируют накопление АФК, что сопровождается снижением уровня восстановленного глутатиона, с чем, в свою очередь, связан рост активности ГР и снижение активности ГТ. Прямая положительная связь между активностью каталазы и ГТ показана в работе Wang с соавторами, при воздействии ксенобиотиков на эндотелиальные клетки мышей (Wang et al., 2009). Сообщается, что повышенная продукция Cu/Zn-СОД или каталазы вызывает, в свою очередь, увеличение активности ГТ, и связана с регуляцией арил-гидрокарбонowego рецептора и его генов-мишеней, таких как гены ферментов, метаболизирующих ксенобиотики.

Сопоставление динамики активности антиоксидантных ферментов при воздействии сМК24 на Ф1 указывает, что к 24 ч имеется дисбаланс между активностями

каталазы и глутатионзависимых ферментов, в отличие от воздействия сМКЗ. По-видимому, это связано с тем, что в данный период происходит снижение уровня апоптоза, обеспечиваемого, за счет активации каталазы, и возможно, снижения уровня H_2O_2 . При этом изменения глутатионзависимых ферментов антиоксидантной системы, происходят, по-видимому, за счет влияния продуктов из сМК24 непосредственно на систему поддержания баланса восстановленного/окисленного глутатиона, поскольку имеются многочисленные данные о том, что редокс-система глутатиона также участвует в клеточной сигнализации модуляции апоптотической клеточной смерти. Это соотношение зависит от уровня NO и изменений в активности NF-kB (Pires et al., 2012), при этом оно может меняться независимо от изменений активности СОД (обезвреживающей АФК) и, по-видимому, каталазы. При этом, S-глутатионирование белков (модификация остатков цистеина путем добавления глутатиона) является механизмом передачи сигнала, с помощью которого клетки эффективно и обратимо отвечают на окислительно-восстановительные затраты. Глутатионирование регулирует большинство клеточных путей. В частности, способствует выживанию клеток путем ядерной транслокации NF-kB и активации генов выживания и гибели клеток – модуляцией активности каспазы 3 (Pastore, Piemonte, 2012). Вследствие этого, активация глутатионзависимых механизмов сигналинга может быть причиной переключения апоптозиндуцирующих сигналов на антиапоптотические в МК с увеличением времени их преинкубации, приводящих к накоплению соответствующих гуморальных продуктов. В свою очередь, преинкубация МК с дексаметазоном потенцировала ингибирующее воздействие гуморальных продуктов из МК на ГТ и стимулирующее – на ГР в Ф1, что коррелировало со снижением активности каталазы. По-видимому, в развитии апоптоза под воздействием продуктов из клеток, преинкубированных с дексаметазоном, основную роль играют механизмы оксидантного стресса. Это свидетельствует в пользу предположения, что апоптоз МК, вызываемый дексаметазоном, сопровождается накоплением H_2O_2 , которая в составе сМК24 может усиливать апоптоз в клетках-мишенях.

При исследовании влияния супернатанта Ф1 на МК, показано, что 30-минутная инкубация сопровождалась снижением активности каталазы в МК на 73% ($P < 0,01$) по сравнению с контролем (рис. 14, а). Напротив, 24-часовая инкубация МК с сФ1-24 способствовала увеличению активности каталазы в 1,9 раз по сравнению с контролем.

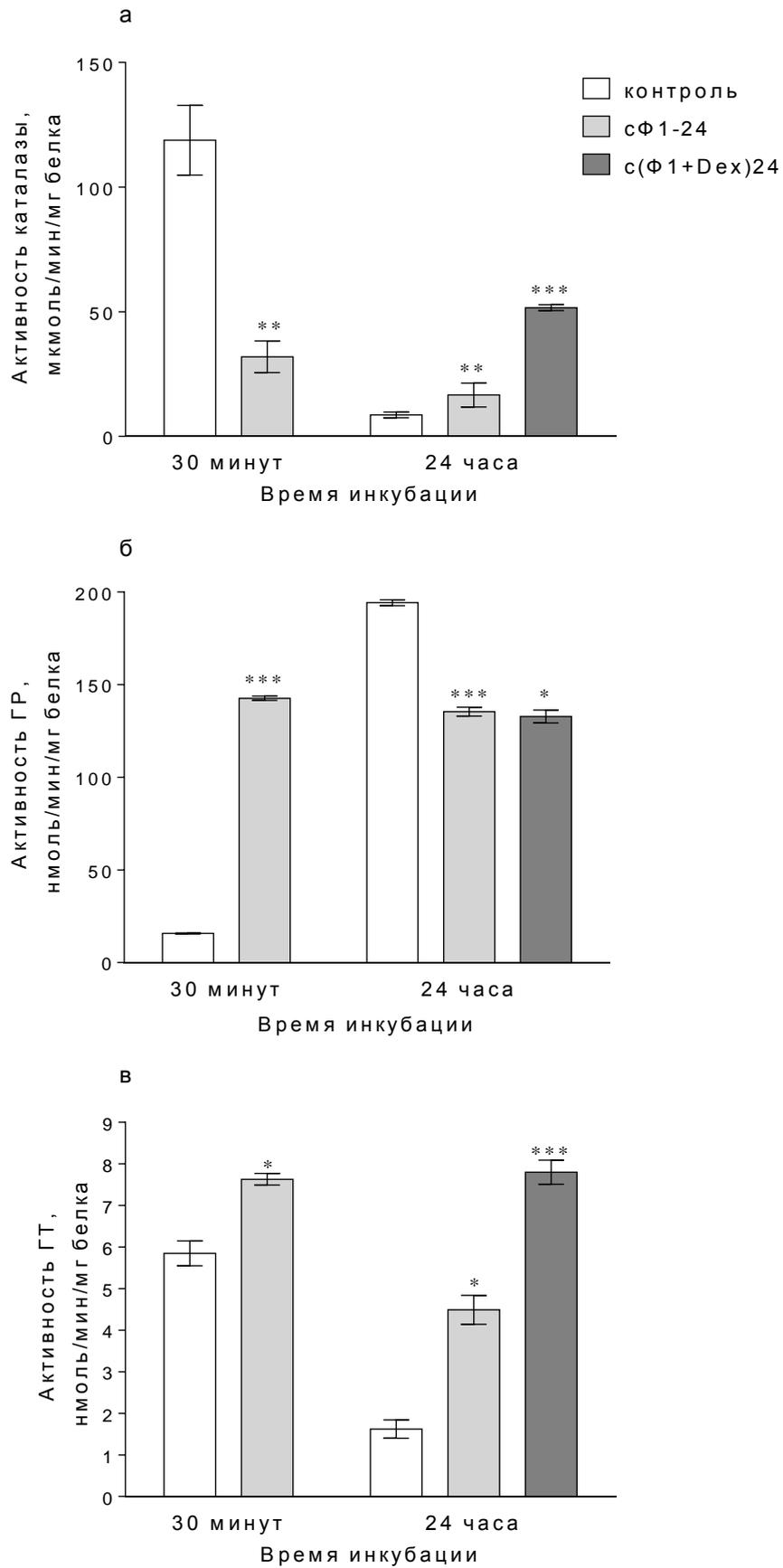


Рис. 14. Изменение активности каталазы (а), ГР (б) и ГТ (в) в МК при инкубации с супернатантом Ф1. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

При добавлении в среду инкубации Ф1 дексаметазона активность каталазы в МК через 24 ч инкубации с с(Ф1+Dex)24 увеличивалась в 6 раз по сравнению с контролем (рис. 14, а). Активность ГР в МК при добавлении сФ1-24 значительно увеличивалась (в 9 раз по сравнению с контролем) через 30 мин инкубации (рис. 14, б), а через 24 ч снижалась – на 30% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем. При добавлении в среду преинкубации Ф1 дексаметазона, с(Ф1+Dex)24 не влиял на активность ГР в МК при сравнении с действием сФ1-24 (рис. 14, б). Активность ГТ, возрастала с увеличением времени инкубации МК с супернатантом Ф1 (рис. 14, в): добавление к МК сФ1-24 через 30 мин инкубации стимулировало активность ГТ на 28% ($P < 0,05$), а через 24 ч - увеличивало в 1,8 раза по сравнению с контролем. Инкубация в течение 24 ч МК с(Ф1+Dex)24 приводила к увеличению активности фермента в 4,9 раз по сравнению с контролем (рис. 14, в).

Таким образом, и при воздействии супернатанта Ф1 на МК отмечены изменения в активности всех исследованных антиоксидантных ферментов. Так, снижение активности каталазы через 30 мин инкубации, по-видимому, связано с развитием в МК оксидантного стресса, вызванного повышением уровня АФК, продуцируемых Ф1, в окружающей МК среде инкубации, учитывая, что в самих Ф1 через 30 мин инкубации развивался апоптоз (рис. 10, а, г). Возможность регуляции взаимодействия иммунных клеток позвоночных через выделяемые клетками АФК описана Sabbione et al. (2013), которые показали, что нейтрофилы могут модулировать ответ Т-лимфоцитов, используя в качестве сигнальных молекул продуцируемые ими АФК.

Напротив, рост активности каталазы через 24 ч инкубации МК с сФ1-24 происходил, по-видимому, в ответ на снижение уровня оксидантного стресса, индуцированного гуморальными продуктами из Ф1, в которых во время 24-часовой инкубации уровень апоптоза был низкий (рис. 3-5), что, по-видимому, сопровождалось снижением уровня АФК в среде инкубации МК с сФ1-24. Вместе с тем, сравнение полученных результатов с данными о том, что воздействие супернатанта Ф1 через 30 мин инкубации вызывало в МК снижение уровня апоптоза (рис. 11 а, в), а через 24 ч, напротив, стимулировало его рост по сравнению с контролем (рис. 11 б, в), свидетельствует о том, что в данных условиях каталаза не оказывала защитный эффект в отношении развития апоптоза.

По-видимому, развитие апоптоза в МК при воздействии гуморальных продуктов из Ф1 могло происходить по независимым от внутриклеточных АФК путям. В то же время известно, что цитокины могут как повышать, так и снижать уровень апоптоза, при этом их антиапоптотическое действие на ранних стадиях инкубации может осуществляться независимо от их влияния на NF- κ B, через антиапоптотическую протеинкиназу (Madge, Rober, 2000). Это свидетельствует о возможной роли ИЛ-1 α -ПВ как внутриклеточного медиатора влияния АФК, продуцированных в Ф1, на МК.

При этом ключевую роль в развитии апоптоза могла играть не перекись водорода, а оксид азота, для которого показана возможность как антиапоптотического действия через антиапоптотическую протеинкиназу (Mejía-García et al., 2013), так и проапоптотического (Yim et al., 2013), при этом синтез NO зависит от уровня цитокинов. Кроме того, механизмы воздействия на сигнальные системы NO и АФК могут быть независимы (Kolamunne et al., 2013).

Активность каталазы в МК при воздействии супернатантов Ф1 возрастала еще более, при преинкубации Ф1 с дексаметазоном. Поскольку ранее было показано, что в самих Ф1 24-часовая инкубация с дексаметазоном приводила к росту уровня апоптоза (рис. 5, б), и с(Ф1+Dex)24 также стимулировал рост апоптоза в МК, получает подтверждение предположение, что развитие апоптоза в МК индуцируется АФК, продуцируемыми Ф1, но АФК не являются внутриклеточными медиаторами апоптоза в этих клетках.

Активность ГР изменялась противоположно изменениям активности каталазы. Отрицательная взаимосвязь между изменениями активности ГР и каталазы объясняется, по-видимому, возрастанием уровня окисленного глутатиона и снижении активности каталазы. Воздействие с(Ф1+Dex)24 на активность фермента в МК не отличалось от действия сФ1-24. В целом, это свидетельствует в пользу предположения о ведущей роли изменений в уровне H₂O₂ и, соответственно, активности каталазы, в механизмах воздействия на антиоксидантную ферментную систему в МК гуморальных продуктов из Ф1, преинкубированных как в отсутствие, так и в присутствии дексаметазона.

Снижение активности ГТ, как и активности каталазы, в ответ на 30-минутное воздействие сФ1-24 могут отражать увеличение уровня АФК в клетке в ответ на противоапоптотическое влияние Ф1, так как одна из функций ГТ – обезвреживание продуктов перекисидации липидов. Изменения активности ГТ через 24 ч инкубации

позитивно коррелировали с изменениями активности каталазы. Добавление к МК с(Ф1+Dex)24 еще в большей степени увеличивало активность фермента по сравнению с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу представлений о том, что именно H_2O_2 , продуцируемая Ф1, играла роль межклеточного медиатора и подтверждают ведущую роль каталазы в изменениях антиоксидантной ферментной системы в МК.

Таким образом, если в Ф1 апоптоз при воздействии гуморальных продуктов из МК развивался на фоне снижения активности каталазы и ГТ и росте активности ГР, то в МК, напротив, - при росте активности каталазы и ГТ и снижении активности ГР. По-видимому, эти клетки различаются между собой по регуляторным механизмам, и возможно, это связано с различиями в их функциональной активности. Отсутствие у МК фагоцитарных функций, обуславливает их неспособность к «респираторному взрыву», что, по-видимому, является причиной более низкого уровня АФК в этих клетках по сравнению с Ф1 (Dolmatova et al., 2003), при этом, уровень фонового апоптоза у МК значительно выше (Долматова, Заика, 2007). Соответственно, пути регуляции апоптоза этих типов клеток могут быть различны. Так, известно, что у позвоночных нейтрофилы отвечают на сигналы, проапоптотичные для других лейкоцитов, противоположным образом: фагоцитоз бактерий задерживает апоптоз в нейтрофилах, ускоряя его в моноцитах (Маянский и др., 1999). В то же время, усиление продукции АФК и развитие окислительного стресса предшествует апоптозу гранулоцитов. Способность регулировать программу собственной гибели, адаптируя ее к внешним условиям, указывает на присутствие в нейтрофилах и моноцитах позвоночных факторов, управляющих сигналами в системе апоптоза (Mosser, Edwards, 2008; Sica, Mantovani, 2012). В частности, таким медиатором в моноцитах является цАМФ (Kalim, Groettrup, 2013). Показано также, что в предшественниках В-лимфоцитов позвоночных рост цАМФ мог, как увеличивать уровень апоптоза, так и снижать его, регулируя уровень свободного белка p53 (Naderi et al., 2013).

В эозинофилах человека было показано, что рост цАМФ связан именно с ростом уровня H_2O_2 в клетках (Ezeamuzie, Taslim, 2006). Известна тесная связь уровня активности НАДН-оксидазы в клетке с уровнем синтеза цАМФ (Ezeamuzie, Taslim, 2006).

Возможно, вариации в уровне синтеза АФК в исследуемых клетках голотурии *E. fraudatrix* (Ф1 и МК), и, соответственно, чувствительности к уровню цАМФ, определяют разницу в направленности клеточного ответа в этих клетках, в том числе, изменения в антиоксидантной ферментной активности.

В целом, результаты исследования указывают на то, что эффект клеток-продуцентов на клетки мишени зависел от функционального состояния как первых, так и вторых. При этом сравнение данных, полученных при изучении взаимодействия двух типов клеток при 24-часовом сроке преинкубации клеток-продуцентов, свидетельствует о том, что Ф1 и МК действовали на антиоксидантную ферментную защиту своих клеток-мишеней при длительной инкубации (24 ч) противоположным образом: воздействие супернатанта МК на Ф1 вызывало преимущественно стимуляцию антиоксидантной ферментативной защиты в течение всего периода инкубации, а при воздействии супернатанта Ф1 на МК отмечено первоначальное (30 мин) снижение активности каталазы на фоне роста активности глутатион-зависимых ферментов, с последующим, к 24 ч, ростом антиоксидантной ферментативной защиты. При этом в Ф1, в отличие от МК, уровень антиоксидантной ферментной защиты влиял на развитие апоптоза. Эти результаты указывают на наличие различных регуляторных внутриклеточных механизмов апоптоза в этих двух типах клеток, предположительно, H_2O_2 -зависимые в Ф1 и NO-зависимые – в МК. Полученные данные свидетельствуют также о различной роли этих клеток (до сих пор недостаточно исследованной) в иммунном ответе у голотурий.

Дексаметазон, добавленный к среде преинкубации, модулировал эффекты гуморальных продуктов при межклеточном взаимодействии: снижал уровень антиоксидантной ферментной защиты в фагоцитах при воздействии гуморальных продуктов из МК, и, напротив, стимулировал его в МК, при воздействии среды инкубации фагоцитов. Известно, что глюкокортикоидные гормоны могут регулировать внутриклеточные механизмы у позвоночных животных различными путями (Herold et al., 2006), в том числе, ингибируя синтез простагландинов, являющихся «локальными гормонами» (Pasmanik et al., 1991), осуществляющими свое действие через цАМФ-зависимые механизмы (Kalim, Groettrup, 2013). Дексаметазон в концентрации 100 мкМ также противодействовал апоптозстимулирующему эффекту простагландина E_2 в МК, но, в то же время, не снижал апоптоз, вызванный простагландином E_2 в Ф1 голотурии *E.*

fraudatrix (Dolmatova, Zaika, 2010). Различия в цАМФ-зависимых механизмах регуляции функциональной активности Ф1 и МК могут лежать в основе отмеченных в настоящей работе различий в механизмах воздействия их друг на друга.

Полученные данные согласуются с известными представлениями о ключевой роли H_2O_2 в механизмах проапоптотического действия дексаметазона у позвоночных (Jaramillo et al., 2009). При этом, повышая уровень продукции АФК, прежде всего H_2O_2 , в фагоцитах и, напротив, снижая уровень оксидантного стресса в МК, дексаметазон может ограничивать функциональную активность клеток голотурий. Это свидетельствует в пользу предположения о наличии у голотурий гормональной (стероидной) регуляции иммунного ответа, сходной с таковой у позвоночных.

Полученные результаты свидетельствуют также о том, что иммунные клетки беспозвоночных, как и у позвоночных, могут оказывать взаиморегулирующее действие, и различия как экстраклеточных, так и внутриклеточных механизмов взаимодействия, в том числе, на оксидантно-антиоксидантный баланс клеток, обеспечивают тонкую настройку иммунного ответа. Кроме того, такое взаимодействие может регулироваться гормонально, о чем свидетельствуют полученные данные о модулирующем действии дексаметазона на активность антиоксидантных ферментов, приводящим к изменению функциональной активности обоих типов исследованных клеток, и способствующим, по-видимому, ограничению активности морулярных клеток. Полученные результаты свидетельствуют о сложности регуляции иммунного ответа у голотурий, вероятно, и обеспечивающей тот высокий уровень иммунной защиты, который характерен для этих животных.

3.2.2. Влияние дексаметазона на кооперационный клеточный ответ МК и Ф2 голотурии *E. fraudatrix*

Наличие у голотурий также другого типа фагоцитов - Ф2- ставило задачу выяснения возможности и механизмов передачи апоптозмодулирующих сигналов между МК и Ф2 и их модуляции дексаметазоном. Для получения супернатантов клеток, предположительно содержащих апоптозмодулирующие вещества, Ф2 и МК были преинкубированы с ФСБН или дексаметазоном в концентрации 100 мкМ в течение 3 ч.

Уровень апоптоза в Ф2 и МК при их гуморальном взаимодействии и его регуляция дексаметазоном. Для исследования возможного воздействия апоптозмодулирующих продуктов из МК на Ф2 и влияния на этот процесс

дексаметазона, Ф2 инкубировали с супернатантами, полученными после центрифугирования МК, преинкубированных в ФСБН или с добавлением дексаметазона в концентрации 100 мкМ (в соответствии со схемой эксперимента, представленной на рис. 2). Контролем являлись Ф2, преинкубированные в ФСБН.

При 18-часовой инкубации Ф2 как в контроле, так и при добавлении сМКЗ или супернатанта МК, преинкубированных 3 ч с дексаметазоном (с(МК+Dex)3) наблюдался выраженный апоптоз (рис. 15, а). Окрашивание Hoechst 33342 показало (рис. 15, б), что количество апоптотических клеток увеличилось по сравнению с контролем, как при 18-часовом воздействии сМКЗ, так и с(МК+Dex)3, в 2,5 и 3,5 раза, соответственно.

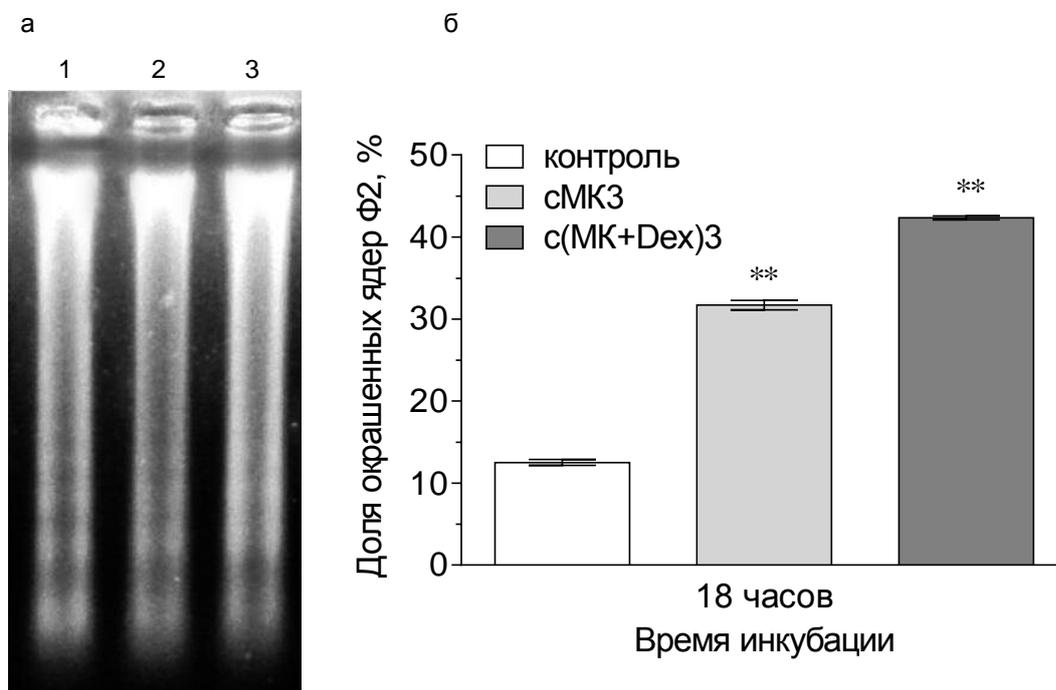


Рис. 15. Фрагментация ДНК (а) и доля окрашенных Hoechst 33342 ядер (б) Ф2 преинкубированных 18 ч с супернатантом МК: 1 - контроль Ф2; 2 – Ф2 + супернатант МК; 3 – Ф2 + супернатант МК, преинкубированных с дексаметазоном, 100 мкМ. ** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Для исследования возможного воздействия апоптозмодулирующих продуктов из Ф2 на МК и влияния на этот процесс дексаметазона, МК инкубировали с супернатантами, полученными после центрифугирования Ф2, преинкубированных 3 часа в ФСБН (сФ2-3) или с добавлением дексаметазона в концентрации 100 мкМ ((Ф2+Dex)3) (в соответствии со схемой эксперимента, представленной на рис. 2). Контролем являлись МК, преинкубированные в ФСБН.

По результатам электрофореза ДНК было выявлено, что при 18-часовой инкубации МК наблюдался апоптоз как в контроле, так и при добавлении к МК сФ2-3 (рис. 16, а). При добавлении в среду преинкубации Ф2 дексаметазона, последующая 18-часовая инкубация с с(Ф2+Dex)3 приводила к снижению апоптоза в МК (рис. 16, а). Окраска Hoechst 33342 показала, что количество апоптотических МК увеличивалось при 18-часовой инкубации с сФ2-3 на 65% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем, а при инкубации с с(Ф2+Dex)3 уровень апоптоза приближался к контрольному уровню (рис. 16, б).

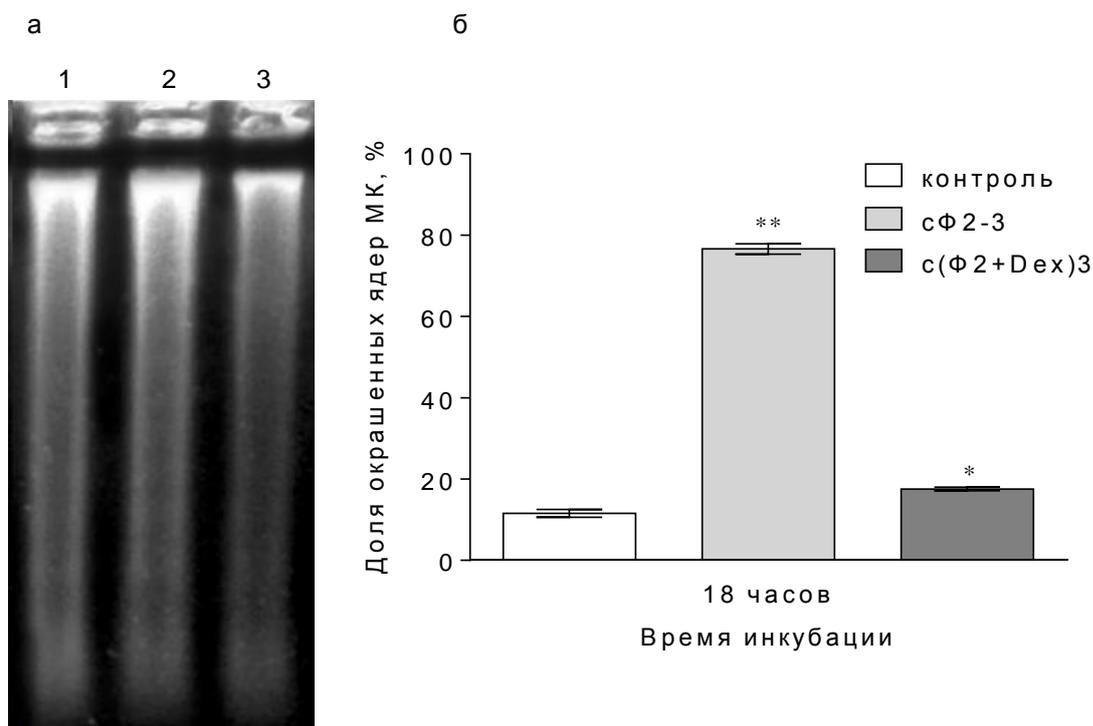


Рис. 16. Фрагментация ДНК (а) и доля ядер окрашенных Hoechst 33342 (б) МК проинкубированных 18 ч с супернатантом Ф2: 1 - контроль МК; 2 – МК + супернатант Ф2; 3 – МК + супернатант Ф2, преинкубированных с дексаметазоном, 100 мкМ. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Таким образом, при исследовании возможности передачи апоптозмодулирующих сигналов между МК и Ф2 было выявлено, что супернатант МК оказывал на Ф2 проапоптотическое действие. Учитывая, что в самих МК, при небольшом сроке инкубации (30 мин), наблюдался выраженный апоптоз (рис. 11 а, рис. 11 в), можно предположить, что МК при этом выделяют проапоптотические вещества, оказывающие апоптозстимулирующее действие на Ф2. Добавление дексаметазона (100 мкМ) в среду преинкубации усиливало апоптозстимулирующий эффект МК на Ф2. Необходимо

отметить, что действие сМКЗ на апоптоз обоих типов фагоцитов Ф1 и Ф2 было сходным.

Аналогичным образом, гуморальные продукты из супернатанта Ф2 стимулировали апоптоз в МК. Таким образом, супернатанты двух типов иммунцитов действовали на клетки-мишени однонаправлено. Однако преинкубация Ф2 с дексаметазоном, по-видимому, стимулировала в них выработку антиапоптотических продуктов, которые вызывали в МК снижение уровня апоптоза. Такой эффект дексаметазона на Ф2 голотурий соответствует данным литературы о том, что глюкокортикоидные гормоны могут быть не только индукторами, но и ингибиторами апоптоза в зависимости от типа иммунной клетки и ее зрелости. Так, в отличие от тимоцитов, быстро подвергающихся апоптозу в ответ на ряд индукционных стимулов, включая глюкокортикоиды (Clarke et al., 1993; Mann et al., 2000), моноциты, эозинофилы и Т-лимфоциты устойчивы к глюкокортикоидиндуцированному апоптозу (Zhou et al., 2009; Zen et al., 2011). Зрелые нейтрофилы человека, как и все фагоцитирующие клетки, легко подвержены апоптозу, однако при их совместной инкубации с глюкокортикоидами апоптоз не происходит (Liles et al., 1995; Zen et al., 2011). Этот защитный эффект глюкокортикоидов на нейтрофилы человека достигается за счет ингибирования апоптоза, причем, при тех концентрациях дексаметазона, в которых он вызывает выраженный апоптоз тимоцитов. Механизмы ингибирования апоптоза глюкокортикоидами до конца не выяснены. Полагают, что в нейтрофилах человека, глюкокортикоиды могут влиять на апоптоз этих клеток через ингибирование экспрессии белка p53 (индуктора апоптоза в различных клетках и тканях) (Chiou et al., 1994; Zen et al., 2011) или индукцию экспрессии bcl-2 (Mann et al., 2000; Hildeman et al., 2003; Zen et al., 2011). Антиапоптотический эффект дексаметазона на иммунные клетки позвоночных также может осуществляться через ингибирование продукции цитокинов, в частности ИЛ-1 α (Schmidt et al., 2004). В связи с этим проведено исследование по выявлению участия ИЛ-1 α -ПВ в гуморальном взаимодействии Ф2 и МК и его регуляции дексаметазоном.

Уровень ИЛ-1 α -подобных веществ в Ф2 и МК при их гуморальном взаимодействии и его регуляция дексаметазоном. Исследование влияния супернатанта МК, преинкубированных в течение 3 ч в ФСБН или в присутствии дексаметазона (100 мкМ), на продукцию ИЛ-1 α -ПВ Ф2 показало, что 18-часовая

инкубация Ф2 с сМКЗ не влияла на уровень ИЛ-1 α -ПВ (рис. 17, а). При 18-часовой инкубации Ф2 с с(МК+Dex)3 отмечена тенденция к снижению концентрации ИЛ-1 α -ПВ (рис. 17, а). При 18-часовой инкубации МК с супернатантом Ф2, преинкубированных в течение 3 ч с ФСБН, (сФ2-3) зарегистрировано значительное снижение уровня ИЛ-1 α -ПВ (на 75% ($P<0,01$)) и супернатантом Ф2, преинкубированных в течение 3 ч с дексаметазоном (100 мкМ), (с(Ф2+Dex)3) - на 70% ($P<0,05$) (рис. 17, б).

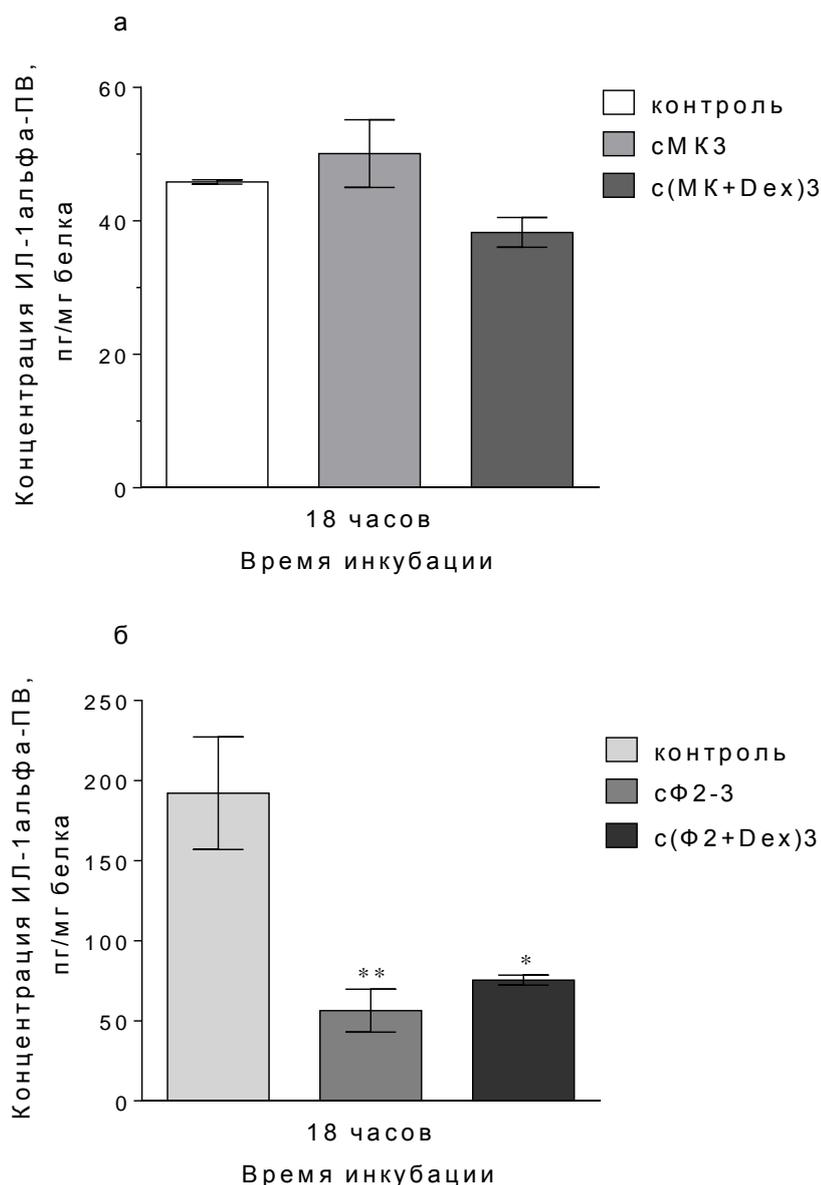


Рис. 17. Концентрация ИЛ-1 α -ПВ в Ф2 (а), преинкубированных 18 ч с супернатантом МК и в МК (б), преинкубированных 18 ч с супернатантом Ф2.

* $P<0,05$; ** $P<0,01$ по сравнению с контролем.

Полученные данные свидетельствуют, что только сФ2 способен снижать уровень ИЛ-1 α -ПВ в МК. При воздействии сМК на Ф2 изменений в уровне ИЛ-1 α -ПВ не

зарегистрировано. По-видимому, в Ф2, при преинкубации, образуются гуморальные вещества, которые при последующей 18-часовой инкубации сФ2-3 с МК способны значительно снижать в последних уровень ИЛ-1 α -ПВ. Сравнительный анализ показывает, что такое снижение концентрации ИЛ-1 α -ПВ сопровождалось увеличением уровня апоптоза в МК при воздействии сФ2-3 по сравнению с контролем.

Одним из механизмов реализации биологических функций цитокинов является поддержание численности иммунных клеток путем модуляции программы апоптотической гибели (Ярилин, 1996; Чечина и др., 2009). Следует отметить, что влияние цитокинов, как регуляторов апоптоза, на клетки неоднозначно: в зависимости от типа клетки они выступают в роли индукторов или ингибиторов апоптоза. Известно, что при действии некоторых цитокинов запускается эндогенная программа защиты клеток от апоптоза, опосредованная через белки bcl-2, bcl-xL, а ряд других цитокинов, в том числе ИЛ-1 α , напротив, обладают способностью индуцировать апоптоз. Характер ответа клетки, на действие того или иного цитокина, зависит от его концентрации, а также от микроокружения, типа или функционального статуса (степень функциональной активности, состояние рецепторного клеточного аппарата) самой клетки-мишени (Новицкий и др., 2008; Callard et al., 2003). Более того, исследования, проведенные на нейтрофилах человека, показали, что эти клетки могут быть частично или полностью освобождены от апоптоза с помощью цитокинов (Colotta et al., 1992; Riera-Romo et al., 2016).

Механизмы проапоптотического действия цитокинов до конца не выяснены. Среди множества факторов, опосредующих эффекты цитокинов, выделяют редокс-состояние клетки-мишени, которое определяется интенсивностью внутриклеточной продукции АФК, являющихся важными внутриклеточными участниками цитокининдуцированного апоптоза (Рязанцева и др., 2008; Чечина и др., 2009).

Отсутствие изменения концентрации ИЛ-1 α -ПВ в Ф2 при 18-часовой инкубации с сМК3 (рис. 17, а) не коррелировали с изменениями уровня апоптоза (рис. 15). По-видимому, апоптоз в этих клетках обусловлен другими механизмами.

Дексаметазон, по-видимому, не обладает выраженной способностью вызывать в МК синтез веществ, влияющих на ИЛ-1 α -ПВ в Ф2. Действие Ф2 на МК, стимулирующее в них повышение продукции гуморальных веществ, вызывающих апоптоз в Ф2, обусловлено другими механизмами.

Учитывая, ранее обнаруженные различия в уровне продукции АФК, активности антиоксидантных ферментов (СОД и каталазы) (Долматова и др., 2004) и чувствительности к апоптозу (Долматова, Заика, 2007), полученные данные подтверждают предположение о том, что Ф1 и Ф2 различаются между собой по апоптозрегулирующим механизмам. Возможно, это связано с тем, что эти клетки различаются по функциональной активности.

Активность антиоксидантных ферментов в Ф2 и МК при их гуморальном взаимодействии и его регуляция дексаметазоном. Для понимания роли оксидантно-антиоксидантного баланса в апоптозе при взаимодействии Ф2 и МК были проведены исследования динамики их антиоксидантных ферментов.

Было выявлено, что через 18 ч инкубации Ф2 с сМКЗ активность каталазы снижалась на 42% ($P < 0,001$), а с с(МК+Dex)3 - увеличивалась на 66% ($P < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 18, а).

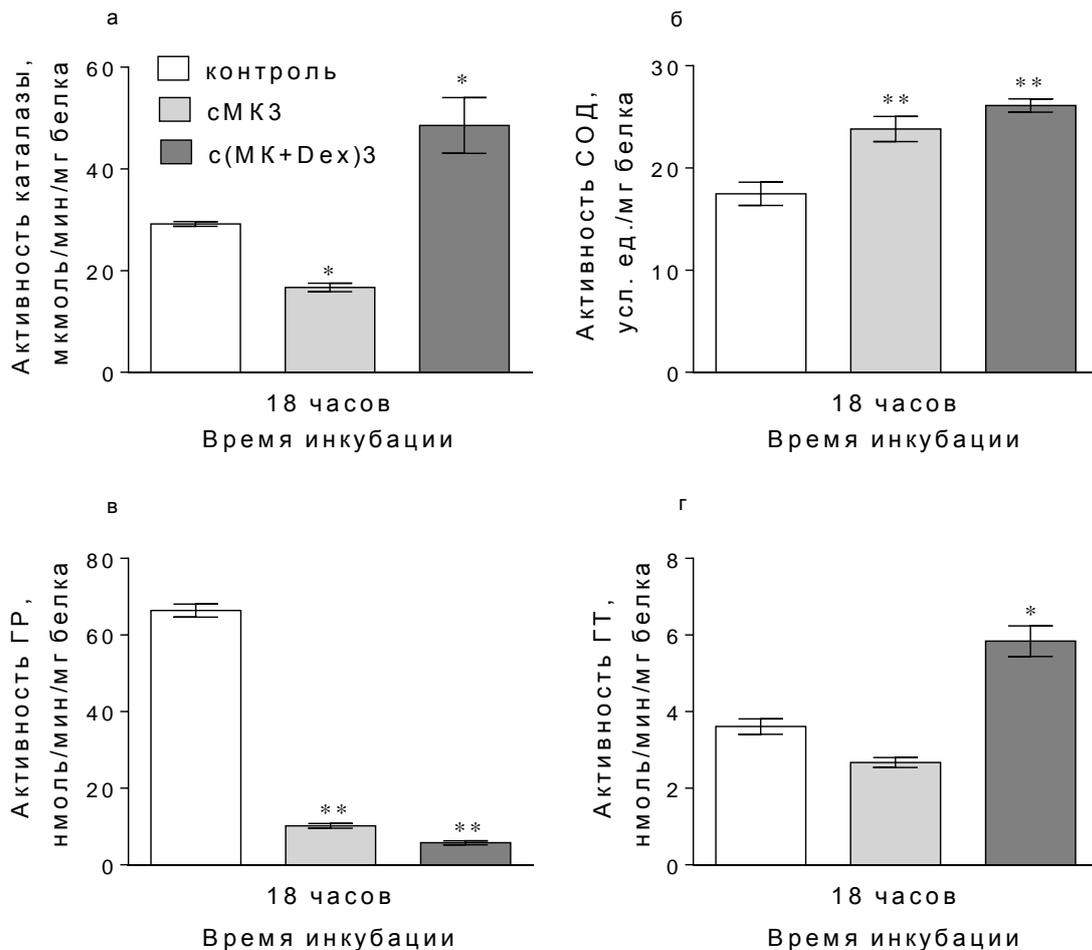


Рис. 18. Изменение активности каталазы (а), СОД (б), ГР (в) и ГТ (г) в Ф2 при 18-часовой инкубации с супернатантом МК. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Активность СОД в Ф2 при 18-часовой инкубации с сМКЗ увеличивалась на 36% ($P < 0,001$) и с с(МК+Dex)3 – на 49% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем (рис. 18, б). Активность ГР через 18 ч инкубации Ф2 с сМКЗ или с(МК+Dex)3 достоверно снижалась в 6,5 и 11,5 раз по сравнению с контролем, соответственно (рис. 18, в). Снижение активности ГТ также наблюдалось при 18-часовой инкубации Ф2 с сМКЗ (на 25%) по сравнению с контролем. Добавление в среду преинкубации дексаметазона способствовало увеличению активности ГТ в Ф2, проинкубированных 18 ч с с(МК+Dex)3, на 61,7% ($P < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 18, г).

Таким образом, выявлены изменения в активности всех исследованных антиоксидантных ферментов. Подобное снижение активности антиоксидантных ферментов может быть связано с увеличением продукции АФК в клетках-мишенях, как это показано для иммунных клеток позвоночных (Долматова и др., 2010). Сопоставление данных уровня апоптоза и динамики активности антиоксидантных ферментов в Ф2 при 18-часовой инкубации с сМКЗ, свидетельствуют, что увеличение уровня апоптоза (рис. 15) происходило на фоне снижения активности каталазы, ГР и ГТ и роста СОД.

По-видимому, в МК во время преинкубации, образуются гуморальные вещества, которые в составе сМКЗ вызывают в Ф2 при 18-часовой инкубации рост уровня АФК, которые, в свою очередь, могут стимулировать увеличение уровня апоптоза и изменение активности антиоксидантных ферментов.

Снижение активности ГР и ГТ, по-видимому, происходит за счет снижения уровня восстановленного глутатиона, израсходованного на обезвреживание АФК. Снижение уровня восстановленного глутатиона в клетках служит индикатором дефицита антиоксидантной защиты и свидетельствует о неспособности клетки препятствовать апоптозу (Плетюшкина и др., 2006). Повышение же уровня восстановленного глутатиона подавляет апоптоз в клетках (Калинина и др., 2014).

Отсутствие изменений концентрации ИЛ-1 α -ПВ (рис. 17, а), на фоне роста активности СОД (вероятно, вследствие увеличения продукции O_2^-) и снижения активности каталазы, указывает на непосредственный (внутриклеточный) АФК-зависимый путь апоптоза в Ф2, под действием гуморальных продуктов, образованных при преинкубации МК.

Преинкубация МК с дексаметазоном приводила, по-видимому, к увеличению в них апоптозмодулирующих продуктов, и при последующей 18-часовой инкубации с с(МК+Dex)3 уровень апоптоза в Ф2 возрастал (рис. 15). Антиоксидантные ферменты, особенно каталаза, не защищали Ф2, при воздействии с(МК+Dex)3, от апоптоза. По-видимому, апоптозстимулирующие продукты из с(МК+Dex)3 вызывали в Ф2 увеличение O_2^- , о чем свидетельствует увеличение активности СОД и снижение – ГР.

Подобный эффект с(МК+Dex)3 на Ф2 голотурий соответствует данным литературы о том, что активность различных антиоксидантных ферментов (таких как СОД и каталаза) может играть существенную роль в выборе программы клеточной реакции в ответ на активацию (Персиянова, Вольский, 2003). Повышенная активность СОД, превращающая супероксидный радикал в перекись водорода, тормозит пролиферативные реакции клеток и способствует развитию апоптоза. Это связано, с проапоптотическим эффектом СОД, связанным со сдвигом соотношения O_2^-/H_2O_2 в клетках в сторону преобладания перекиси водорода (Персиянова, Вольский, 2003). С другой стороны, каталаза, снижающая концентрацию перекиси водорода, ингибирует апоптоз тимоцитов мыши, вызванный дексаметазоном (Персиянова и др., 1998).

Персияновой с соав. (1998) обнаружено, что дексаметазон (100 мкМ), добавленный к гомогенатам клеток тимуса, значительно стимулировал продукцию супероксиданионрадикала, при этом наблюдался выраженный апоптоз тимоцитов. Это свидетельствует о том, что АФК, продукция которых стимулирована глюкокортикоидными гормонами, принимают непосредственное участие в развитии процессов апоптоза, вызванного этими гормонами (Персиянова и др., 1998). Эффект глюкокортикоидов связан с их прямым активирующим влиянием на НАДФН-оксидазу плазматических мембран фагоцитирующих клеток – ферментый комплекс, восстанавливающий кислород с образованием супероксидного радикала и других АФК (Volsky et al., 2001). Показано, что макрофаги могут служить мишенями для воздействия глюкокортикоидов: макрофаги используются, для продуцирования достаточного количества перекиси водорода, которая в свою очередь незамедлительно воздействует на соседние лимфоциты, инициируя апоптоз. Стимуляция апоптоза Т-лимфоцитов глюкокортикоидами, воздействующими через фагоцитирующие клетки, показана также в экспериментах с астроцитами (Gold et al., 1996). Таким образом, представляется

вероятным, что дексаметазон при преинкубации МК стимулирует выработку перекиси водорода, которая в составе с(МК+Dex)3 воздействует на Ф2, вызывая апоптоз.

Однако, с(МК+Dex)3 оказывал на активность каталазы и ГТ в Ф2 стимулирующее действие. Вероятно, дексаметазон стимулировал в МК продукцию веществ, которые в составе с(МК+Dex)3 способствовали увеличению уровня восстановленного глутатиона в Ф2, возможно, из-за подавления АФК (обусловленных увеличением активности СОД и каталазы). По-видимому, механизмы воздействия на Ф2 гуморальных продуктов из МК, под влиянием дексаметазона, и в его отсутствие различны.

При изучении влияния супернатанта Ф2 на МК было выявлено, что 18-часовая инкубация с сФ2-3 приводила к снижению активности каталазы на 44,2% ($P < 0,05$), а с с(Ф2+Dex)3 на 19,4% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем (рис. 19, а).

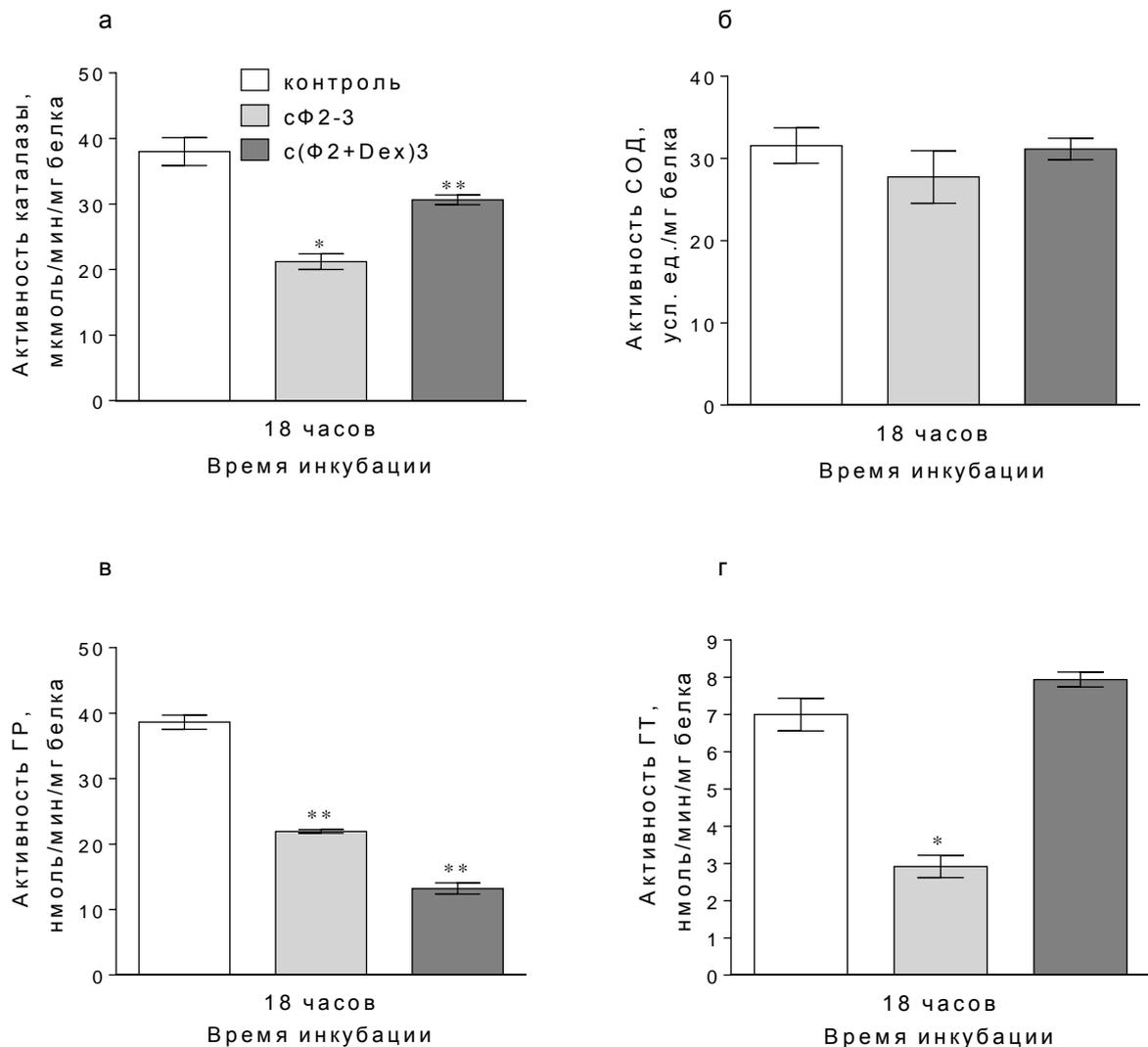


Рис. 19. Изменение активности каталазы (а), СОД (б), ГР (в) и ГТ (г) в МК при 18-часовой инкубации с супернатантом Ф2. * $P < 0,05$; ** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

При 18-часовой инкубации МК с сФ2-3 отмечалась тенденция к снижению активности СОД (на 12%) по сравнению с контролем, а инкубация МК с с(Ф2+Dex)3 способствовала сохранению активности фермента на уровне контроля (рис. 19, б). Активность ГР через 18 ч инкубации МК с сФ2-3 была снижена на 43,2% ($P < 0,001$), а при добавлении в среду преинкубации Ф2 дексаметазона – на 65,8% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем (рис. 19, в). Через 18 ч инкубации МК с сФ2-3 активность ГТ снижалась в 2,3 раза по сравнению с контролем, а при инкубации МК с с(Ф2+Dex)3 активность ГТ также находилась в пределах контрольного уровня (рис. 19, г).

Таким образом, апоптозмодулирующее действие супернатанта Ф2 на МК (рис. 16), в отличие от влияния сМК на Ф2, сопровождалось отсутствием изменений активности СОД, и на фоне снижения каталазы, ГР и ГТ. По-видимому, 3-часовая преинкубация Ф2 приводит к увеличению в них продукции АФК, в частности перекиси водорода, которая, выходя в среду инкубации, как показано на клетках позвоночных (Плетюшкина и др., 2006; Ткачук, 2012). Находясь в составе супернатанта Ф2, перекись водорода при последующей инкубации с МК, осуществляет передачу апоптотического сигнала этим клеткам. Отсутствие достоверных изменений активности СОД в МК при инкубации с сФ2-3 свидетельствует об отсутствии изменений в продукции O_2^- , в то время как снижение активности каталазы указывает на наличие перекиси водорода, и вследствие этого на снижение восстановленного глутатиона. Снижение активности ГТ в МК через 18 ч инкубации с сФ2-3, по-видимому, также связано со снижением уровня восстановленного глутатиона в результате ингибирования активности ГР (рис. 19). Снижение концентрации ИЛ-1 α -ПВ в МК при воздействии сФ2-3 (рис. 17, б) подтверждает, что ведущую роль в передаче апоптозмодулирующего сигнала МК играли не ИЛ-1 α -ПВ, а перекись водорода из Ф2, выполняющая роль сигнальных апоптотических молекул при взаимодействии с МК.

Преинкубация Ф2 с дексаметазоном, меняла направленность апоптозмодулирующего эффекта супернатанта Ф2 на МК, стимулируя, по-видимому, выработку антиапоптотических продуктов, которые, в составе с(Ф2+Dex), вызывали снижение уровня апоптоза в МК (рис. 16), приближая его к контролю. По-видимому, дексаметазон снижал в Ф2, при их преинкубации, уровень АФК, в частности перекиси водорода. Преинкубация Ф2 с дексаметазоном приближала активность каталазы в МК, обработанных с(Ф2+Dex)3 к уровню контроля. Это соответствует представлениям, о

защитном эффекте каталазы при апоптозе иммунных клеток позвоночных (Зенков и др., 1999; Davis et al., 2001; Гераськин, 2017). Также известно о защитном эффекте антиоксидантных ферментов, в том числе и каталазы, в отношении индуцированного глюкокортикоидами апоптоза иммунных клеток позвоночных (Curi, 1998; Персиянова и др., 1998; Sandstrom, Buttke, 1993). Можно предполагать важную роль каталазы в антиапоптотическом действии гуморальных продуктов из Ф2, образованных под влиянием дексаметазона, на МК голотурии *E. fraudatrix*. Следует отметить, что на фоне высокого уровня апоптоза в МК (рис. 17), обработанных супернатантом Ф2, наблюдался дисбаланс между активностями каталазы и глутатионзависимых ферментов. При этом защитный эффект каталазы и ГТ, но не ГР, на противоапоптотическое действие дексаметазона указывает на H₂O₂-зависимый путь регуляции апоптоза в МК. Таким образом, механизмы апоптозстимулирующего действия Ф2 и МК на клетки-мишени различны. Кроме того исследованные типы иммунцитов отличались по чувствительности к воздействию дексаметазона.

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

Полученные результаты о механизмах действия Ф1 и Ф2 на МК получили подтверждение в последующих экспериментах по взаимодействию Ф1 и Ф2.

Влияние Ф2 на уровень апоптоза Ф1 и его модуляция дексаметазоном. Было выявлено, что в контрольных Ф1 инкубация в течение 30 мин приводила к выраженному апоптозу (рис. 20, а). По данным окрашивания Hoechst 33342 в апоптоз вступало более 40% клеток (рис. 20, в). Однако при 30-минутной инкубации Ф1 с супернатантом Ф2, преинкубированных 24 ч (сФ2-24) наблюдалось снижение апоптоза в 4,7 раза по сравнению с контролем (рис. 20, а, в). Через 24 ч инкубации в контрольных Ф1 высокий уровень апоптоза сохранялся (рис. 20, б), и по данным окрашивания Hoechst 33342 составил 31% (рис. 20, в), при инкубации Ф1 с сФ2-24 уровень апоптоза был снижен на 23% ($P < 0,001$) по сравнению с контролем (рис. 20, б, в). После 24-часовой инкубации Ф1 с супернатантом Ф2, преинкубированных 24 ч с дексаметазоном (с(Ф2+Dex)24), апоптоз был значительно снижен: по результатам окрашивания Hoechst 33342 – на 70% по сравнению с контролем (рис. 20, б, в).

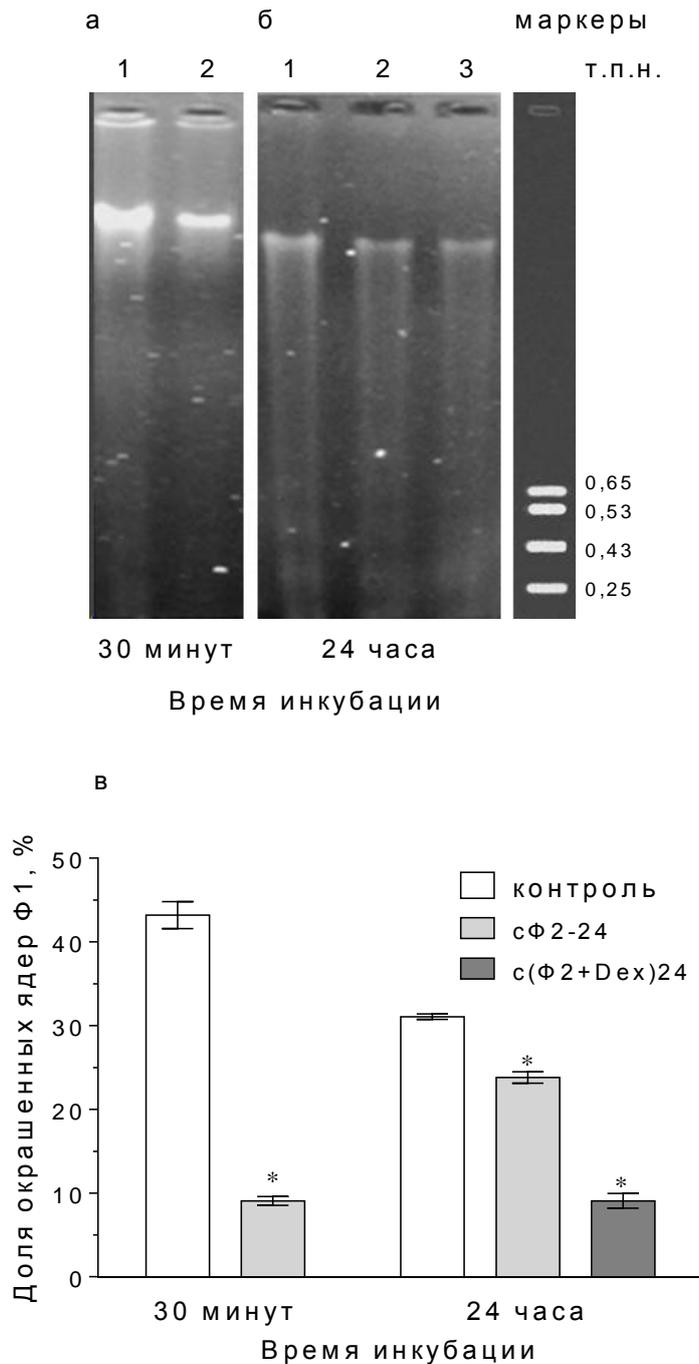


Рис. 20. Фрагментация ДНК (а, б) и доля окрашенных Hoechst 33342 ядер (в) Ф1 при воздействии супернатанта Ф2, преинкубированных 24 ч: 1 - контроль Ф1; 2 - Ф1 + супернатант Ф2; 3 - Ф1 + супернатант Ф2, преинкубированных с дексаметазоном, 100 мкМ. * $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Таким образом, как через 30 мин, так и через 24 ч инкубации супернатант Ф2 оказывал на Ф1 апоптозингибирующее действие, причем с возрастанием времени инкубации эффект супернатанта Ф2 ослабевал. Преинкубация Ф2 с дексаметазоном способствовала значительному снижению апоптоза в Ф1 при инкубации с с(Ф2+Dex)24.

Можно предположить, что в Ф2 под действием дексаметазона увеличивается синтез гуморальных веществ, снижающих уровень апоптоза в Ф1.

Принимая во внимание, что через 24 ч инкубации признаки апоптоза обнаружены как в Ф2, так и в Ф1 (рис 3-5), 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 (Liles et al., 1995; Полетаева и др., 2009).

В ряде работ указывается на сходство сигнальных путей регуляции апоптоза у позвоночных и морских беспозвоночных, в частности, выявлено, что ключевым эффектором в апоптозе моллюсков является цАМФ, при этом его роль может быть как про- так и антиапоптотической (Lacoste et al., 2002; Pirger et al., 2008). Кроме того, у этих животных обнаружен гомолог белка p53, который у них также играет важную роль в апоптозе (Böttger et al., 2008).

Сопоставление результатов исследований по влиянию супернатантов Ф2 и МК на апоптоз в Ф1 свидетельствует, что оба типа клеток (МК и Ф2) выделяют вещества, снижающие апоптоз в Ф1. Эффект зависит от длительности взаимодействия. Максимальный эффект проявлялся в первые 30 мин и наиболее ярко выражен в Ф2. Добавление дексаметазона в среду преинкубации клеток, вызывает в МК синтез веществ с проапоптотическим, а в Ф2 – противоапоптотическим действием на Ф1.

Влияние Ф2 на уровень ИЛ-1 α -подобных веществ в Ф1 и его модуляция дексаметазоном. В связи с выявленным антиапоптотическим действием супернатанта Ф2, на Ф1 при их взаимодействии, представлялось важным выявить роль ИЛ-1 α -ПВ в этом процессе.

Проведенные исследования показали, что инкубация Ф1 в течение 24 ч с сФ2-24 приводила к снижению концентрации ИЛ-1 α -ПВ в Ф1 в 2,3 раза, а с с(Ф2+Dex)24 – в 3,9 раза по сравнению с контролем (рис. 21). Следовательно, ингибирование апоптоза в Ф1 (рис. 20) при инкубации и с сФ2-24, и с с(Ф2+Dex)24, происходило на фоне значительного снижения концентрации ИЛ-1 α -ПВ. По-видимому, снижение апоптоза в

Ф1 сопровождается ингибированием в Ф1 противоапоптотических продуктов, поскольку известно, что у позвоночных животных при увеличении концентрации ИЛ-1 α повышается апоптоз (Чечина и др., 2009).

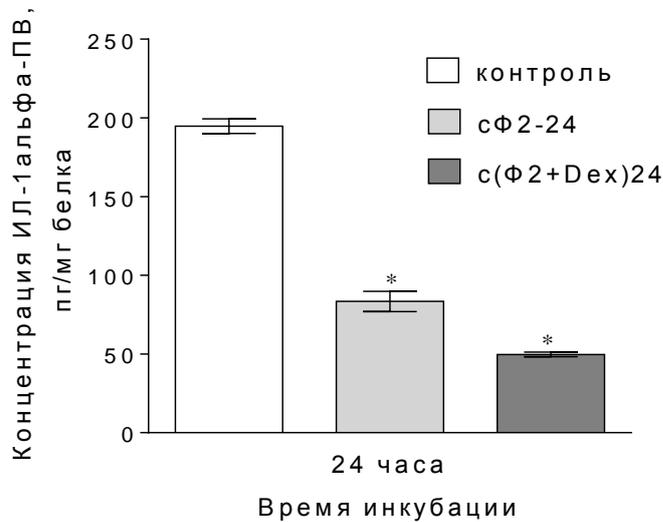


Рис. 21. Концентрация ИЛ-1 α -ПВ в Ф1, проинкубированных 24 ч с супернатантом Ф2. * $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Учитывая данные, что гуморальные продукты, выделяемые из Ф2 через 3 ч преинкубации, предположительно представлены АФК, и в самих Ф2 уровень ИЛ-1 α -ПВ высок (рис. 9), можно предполагать, что снижение уровня ИЛ-1 α -ПВ в Ф1 через 24 ч инкубации (рис. 21) связано с ингибирующим действием АФК на синтез этих веществ в Ф1 по механизму обратной связи, так как Ф1 являются основными продуцентами АФК среди иммунных клеток голотурий (Долматова и др., 2004). Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что у беспозвоночных, как и у позвоночных, дексаметазон может регулировать взаимодействие иммунных клеток на гуморальном уровне, в том числе через модуляцию ИЛ-1 α (Herold et al., 2006; Zen et al., 2011).

Известна способность АФК стимулировать синтез цитокинов в фагоцитах позвоночных (Чечина и др., 2009). Способность же гуморальных продуктов из Ф2, преинкубированных с дексаметазоном, также снижать уровень ИЛ-1 α -ПВ в Ф1 через 24 ч инкубации, по-видимому, может быть связана как с общим снижением уровня АФК в Ф1, обработанных с(Ф2+Dex)24, в которых под воздействием дексаметазона снижен уровень продукции АФК, так и с воздействием на Ф1 каких-то других, пока неидентифицированных продуктов.

Для проверки предположения о роли оксидантно-антиоксидантного баланса в развитии апоптоза при воздействии Ф2 на Ф1, были исследованы изменения антиоксидантной ферментативной активности в Ф1 при воздействии супернатанта Ф2.

Влияние Ф2 на активность антиоксидантных ферментов в Ф1 и его модуляция дексаметазоном. Показано, что через 30 мин инкубации Ф1 с Ф2-24 наблюдалось увеличение активности каталазы в 2 раза по сравнению с контролем (рис 22, а). Увеличение времени инкубации до 24 ч приводило к снижению активности каталазы в 2,5 раза по сравнению с контролем, а при 24-часовой инкубации Ф1 с с(Ф2+Dex)24 активность каталазы сохранялась на контрольном уровне.

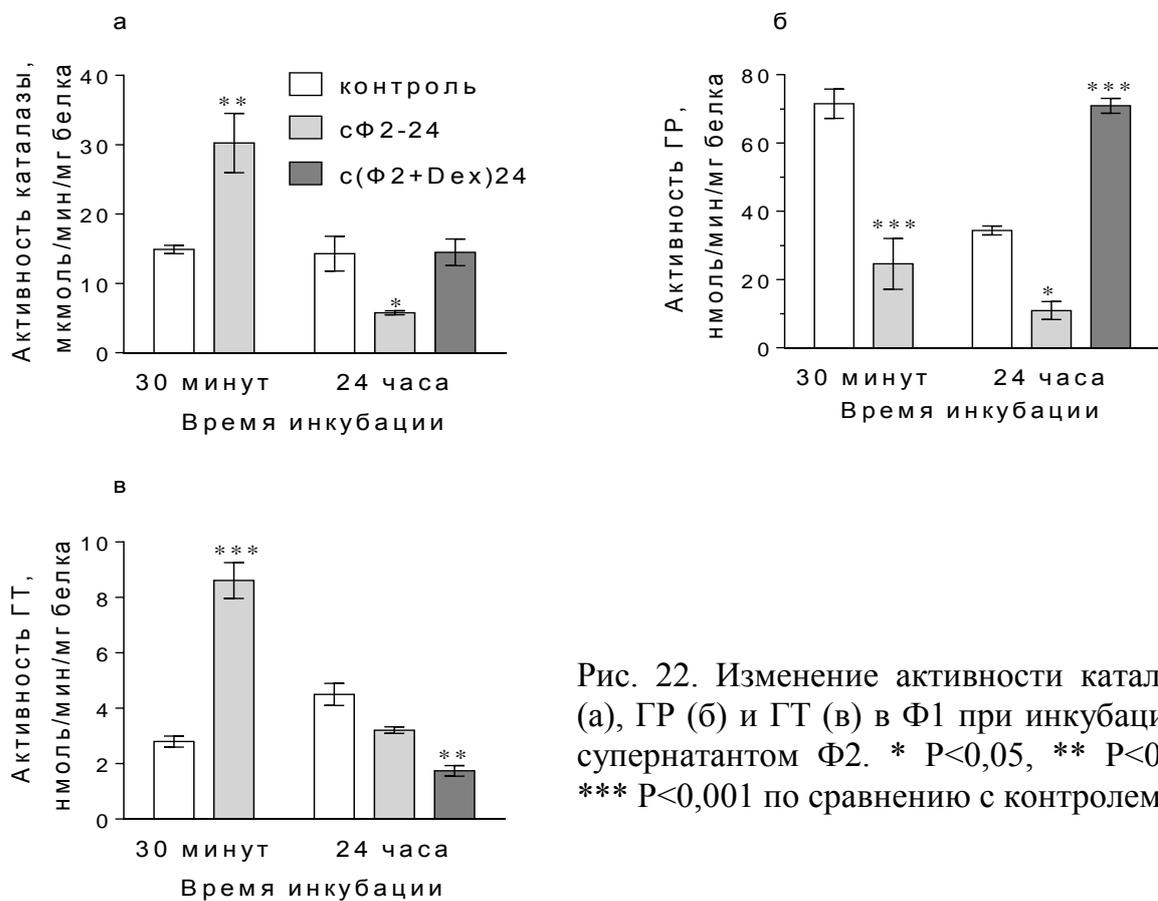


Рис. 22. Изменение активности каталазы (а), ГР (б) и ГТ (в) в Ф1 при инкубации с супернатантом Ф2. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ по сравнению с контролем.

Активность ГР в Ф1 при 30-минутной и 24-часовой инкубации Ф1 с сФ2-24 снижалась в 2,9 и 3,2 раза по сравнению с контролем, соответственно (рис. 22, б). Через 24 ч инкубации Ф1 с с(Ф2+Dex)24 активность ГР, напротив, увеличивалась в 2 раза по сравнению с контролем (рис. 22, б). При 30-минутной инкубации в Ф1 с сФ2-24 активность ГТ увеличилась в 3 раза по сравнению с контролем (рис. 22, в), и снижалась в 1,4 раза по сравнению с контролем при 24-часовой инкубации. При 24-часовой инкубации Ф1 с с(Ф2+Dex)24 - снижалась в 2,6 раза по сравнению с контролем.

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 фермента 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 (Popov 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 Ф1 с сФ2-24 активность всех трех ферментов уменьшалась, что может свидетельствовать о значительном снижении уровня пероксидации в клетке.

Сопоставление данных по динамике активности антиоксидантных ферментов с соответствующими изменениями в уровне апоптоза показало, что снижение уровня апоптоза в Ф1 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 Ф2 при увеличении времени инкубации до 24 ч сопровождалось достоверным снижением активности каталазы в Ф1, вероятно, связанным со снижением процессов пероксидации в клетке. Динамика активности антиоксидантных ферментов в Ф1 при воздействии супернатанта Ф2 подтверждает предположение о том, что снижение апоптоза в Ф1 обусловлено уменьшением в них уровня АФК, по-видимому, за счет стимуляции активности антиоксидантных ферментов перекисью водорода из Ф2, которая в данном случае выступает в роли сигнальной молекулы, как это описано и для иммунных клеток позвоночных (Costantini et al., 2011).

Обработка с(Ф2+Dex)24 вызывала в Ф1 значительное увеличение активности каталазы и ГР, но ингибировала ГТ по сравнению с эффектом при обработке сФ2-24. По-видимому, дексаметазон-индуцированное снижение апоптоза в Ф2 (рис. 5) 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 апоптозмодулирующий эффект зависел от уровня апоптоза в клетках-продуцентах.

Полученные данные о подавлении апоптоза, об активности антиоксидантных ферментов и уровня ИЛ-1 α -ПВ в Ф1 при воздействии гуморальных продуктов из Ф2 свидетельствуют в пользу предположения о том, что два типа клеток функционально сходны по их способности к "респираторному взрыву". Однако, различия в механизмах влияния на них дексаметазона, свидетельствуют о том, что в этих клетках могут реализовываться и различные сигнальные пути. Вместе с тем, наличие разной чувствительности двух типов фагоцитов к дексаметазону открывает возможность дифференцированной модуляции их активности с помощью гормонов, что может быть использовано при дальнейшем изучении функций этих двух типов клеток.

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

В связи с выявленным влиянием дексаметазона на взаимодействие иммуночитов голотурии *E. fraudatrix in vitro*, представляло интерес также выяснение соответствия эффектов, оказываемых дексаметазоном *in vitro*, на его эффекты *in vivo*.

Методом проточной цитометрии было установлено (рис. 23, а), что в Ф1, полученных через 1 час после инъекции животным дексаметазона в концентрации 1 и 10 мкг/г, стимуляция апоптоза (на 48%) происходила только при концентрации дексаметазона 10 мкг/г, а при концентрации 1 мкг/г наблюдалось даже снижение уровня апоптоза - на 71% по сравнению с контролем (Ф1, полученные через 1 ч после инъекции животным ФСБН). Апоптотические процессы происходили на фоне незначительных изменений жизнеспособности Ф1: снижения на 8,5% при концентрации дексаметазона 10 мкг/г, и увеличения на 7% при 1 мкг/г по сравнению с контролем (рис. 23, б). Эти изменения не коррелировали с изменениями уровня апоптоза, что согласуется с данными, полученными на лейкоцитах позвоночных (Curi et al., 1998). Проведенные исследования показали, что дексаметазон *in vivo*, так же как *in vitro*, оказывает дозозависимые эффекты на уровень апоптоза в Ф1: стимулирует апоптоз в высокой дозе и ингибирует в низкой. Следует отметить, что апоптотическое действие дексаметазон оказывает в более высоких концентрациях, по сравнению с его эффектами на клетках

позвоночных (Samchenko et al., 2010). Повышенная резистентность фагоцитов голотурий может быть связана, как с относительной нефизиологичностью дексаметазона для иглокожих, так и с высоким уровнем антиоксидантной ферментной защиты фагоцитов голотурий (Долматова и др., 2004).

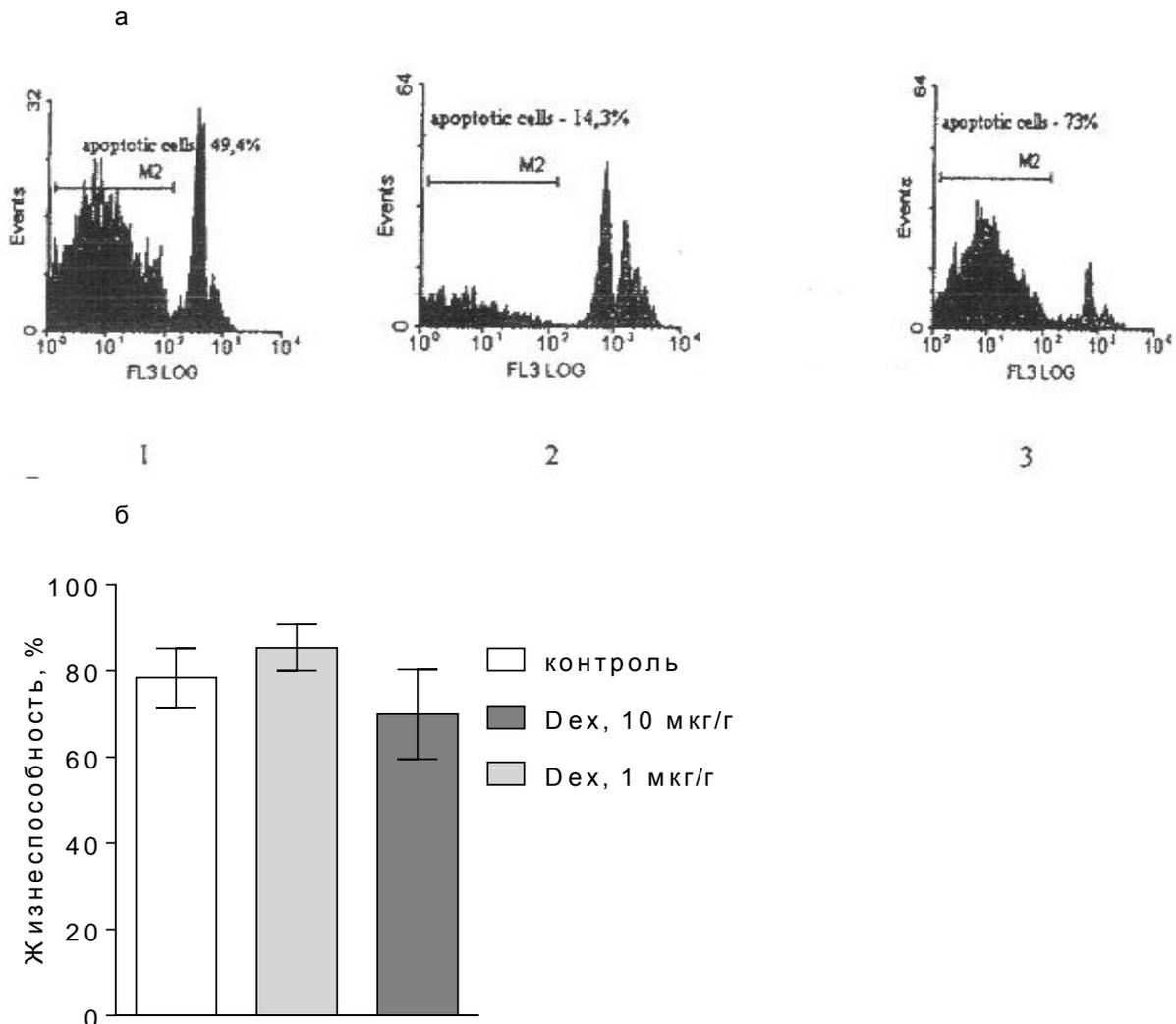


Рис. 23. Влияние дексаметазона на апоптоз (а) и жизнеспособность (б) Φ1 голотурии *E. fraudatrix in vivo*: 1. Φ1, полученные через 1 ч после инъекции животным ФСБН (контроль); 2. Φ1, полученные через 1 ч после инъекции животным дексаметазона, 1 мкг/г; 3. Φ1, полученные через 1 ч после инъекции животным дексаметазона, 10 мкг/г. Апоптоз определяли методом проточной цитометрии. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции (логарифмическая шкала), по оси ординат – количество клеток.

Изучение участия антиоксидантной ферментной системы фагоцитов Φ1 и морулярных клеток при их взаимодействии у животных, получавших дексаметазон *in vivo*, позволило бы не только выявить роль антиоксидантной системы в кооперативном ответе этих клеток на воздействие дексаметазона в условиях *in vivo*, но и уточнить

вопрос о возможности экстраполяции результатов, полученных в экспериментах *in vitro*, на систему *in vivo*. Этим исследованиям посвящена следующая глава.

3.4. Влияние дексаметазона, введенного *in vivo*, на кооперационный клеточный ответ иммунцитов голотурии *E. fraudatrix*

Животные были разделены на 3 группы (в каждой по 5 голотурий): I группа – интактные, II группа – подкожное введение дексаметазона (10 мкг/г), III группа – введение ФСБН. Через 1 ч после инъекции всех животных препарировали, получали целомическую жидкость отдельно для каждой группы животных. Затем получали отдельные фракции иммунцитов: I группа – МК, II и III – Ф1. Осадки клеток ресуспендировали в модифицированной среде 199. Ф1 инкубировали в течение 1 ч при температуре 22°C. Супернатанты Ф1 от голотурий группы II (с(Ф1+Dex, *in vivo*)) или животных группы III (сФ1+ФСБН, *in vivo*) добавляли к суспензиям МК животных группы I в объемном соотношении 1:1. Инкубацию проводили в течение 24 ч при температуре 22°C и отбирали пробы для определения активности антиоксидантных ферментов.

Было выявлено, что в МК (полученных от интактных животных), проинкубированных в течение 24 ч с с(Ф1+Dex, *in vivo*), активность каталазы в клетках снижалась на 27% ($P < 0,001$) по сравнению с воздействием с(Ф1+ФСБН, *in vivo*) (рис. 24, а). Активность ГР напротив, увеличивалась в 2,3 раза (рис. 24, б). При этом наблюдалось снижение активности ГТ – в 2,6 раза (рис. 24, в). Учитывая, что в Ф1, полученных через 1 ч после инъекции животным дексаметазона в концентрации 10 мкг/г, происходила стимуляция апоптоза (рис. 23), полученные данные об изменениях антиоксидантных ферментов в МК проинкубированных в течение 24 ч с с(Ф1+Dex, *in vivo*), свидетельствуют о том, что развитие апоптоза в Ф1, животных, получивших дексаметазон *in vivo*, сопровождалось появлением гуморальных продуктов способных снижать уровень антиоксидантной защиты в МК голотурий. Это соответствует данным, полученным в экспериментах *in vitro*, об ингибирующем действии сФ1 с высоким уровнем апоптоза, на активность антиоксидантных ферментов в МК. Поскольку апоптоз в Ф1 в опытах *in vitro*, сопровождался снижением антиоксидантной ферментной защиты и, по-видимому, связанным с этим накоплением АФК, прежде всего, перекиси водорода, снижение уровня антиоксидантной ферментативной защиты в МК при обработке

c(Ф1+Dex, *in vivo*) свидетельствует также в пользу представлений о модулирующей роли перекиси водорода в переносе сигнала от Ф1 к другим клеткам *in vivo*.

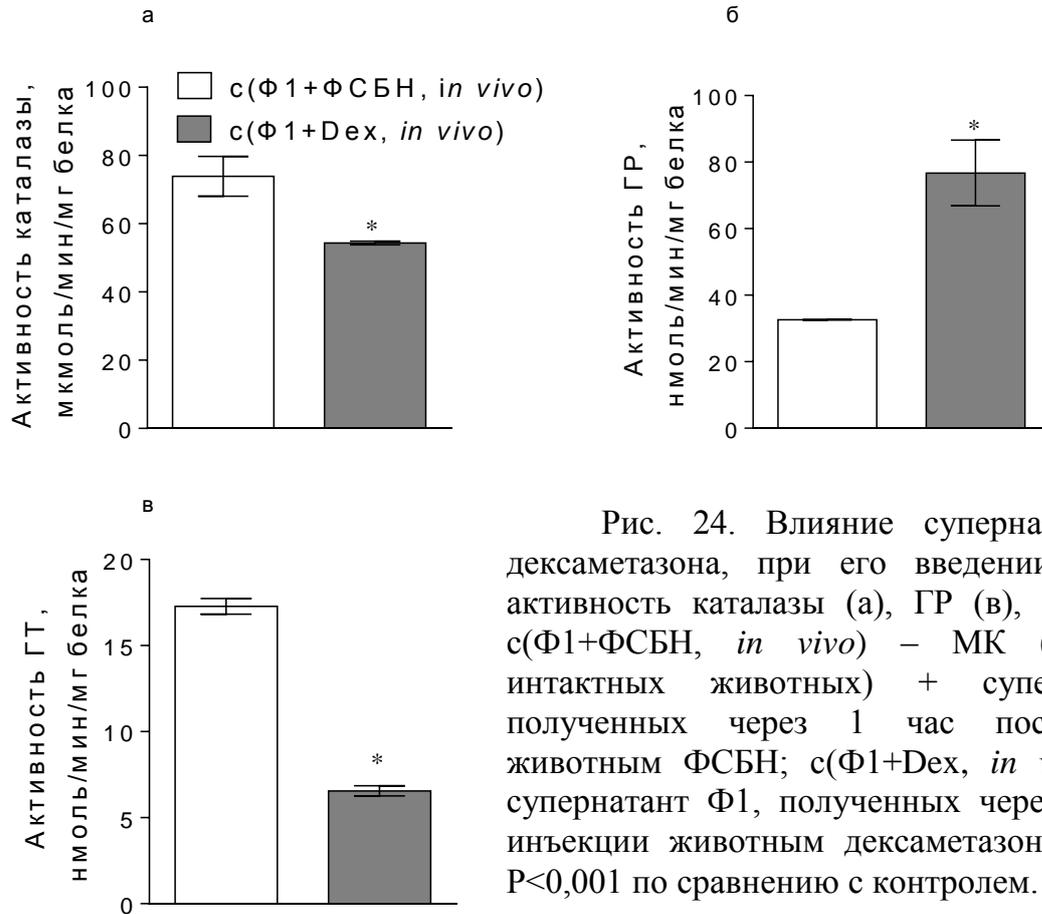


Рис. 24. Влияние супернатантов Ф1 и дексаметазона, при его введении *in vivo*, на активность каталазы (а), ГР (б), ГТ (в) в МК: c(Ф1+ФСБН, *in vivo*) – МК (получены от интактных животных) + супернатант Ф1, полученных через 1 час после инъекции животным ФСБН; c(Ф1+Dex, *in vivo*) – МК + супернатант Ф1, полученных через 1 час после инъекции животным дексаметазона, 10 мкг/г. * P<0,001 по сравнению с контролем.

Вместе с тем обращает на себя внимание факт временного несоответствия между эффектами дексаметазона, используемого *in vitro* и *in vivo*, на активность ферментов в МК через 24 ч инкубации с сФ1. Несмотря на то, что в обоих случаях в Ф1, обработанных дексаметазоном, развивался апоптоз, при 24-часовой инкубации МК с c(Ф1+Dex, *in vivo*) наблюдалось снижение ферментативной защиты, а в опытах *in vitro*, напротив, рост активности антиоксидантных ферментов. По-видимому, это связано с тем, что в опытах *in vivo* использовали Ф1, полученные через 1 ч от начала воздействия дексаметазона, а в опытах *in vitro* – через 24 часа, вследствие чего могла возникнуть разница в концентрации выделяемых в среду инкубации гуморальных продуктов. Частичное подтверждение это предположение получает при сопоставлении данных, полученных в опытах *in vivo*, с результатами, полученными при 30-минутной инкубации МК с сФ1 *in vitro*. Таким образом, воздействие дексаметазона в обоих случаях

сопровождалось появлением в апоптозных клетках сигналов, способных модулировать антиоксидантную защиту клеток-мишеней.

У позвоночных животных глюкокортикоиды являются одним из главных физиологических регуляторов активности иммунокомпетентных клеток *in vivo* (Персиянова и др., 1998; Zen et al., 2011). Учитывая, что в организме иглокожих обнаружены стероидные гормоны (Gurst et al., 1973; Hines et al., 1992; Lafond, Mathieu, 2007), полученные результаты по влиянию дексаметазона на взаимодействие иммунных клеток голотурий свидетельствуют о том, что их иммунный ответ, как и у позвоночных, может регулироваться гормонами. При этом механизмы регуляции дексаметазоном, выявленные *in vitro*, отражают в достаточной степени близко те механизмы гормональной регуляции иммунитета, которые имеются у животных и проявляются в опытах *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование включает анализ механизмов воздействия синтетического глюкокортикоидного гормона дексаметазона на отдельные клетки иммунной системы голотурии *E. fraudatrix* и их кооперативный ответ.

Впервые показана возможность модуляции дексаметазоном апоптоза иммунных клеток голотурии *E. fraudatrix*. При этом *in vitro* обнаружена зависимость влияния дексаметазона на уровень апоптоза в иммуноцитах от концентрации и времени воздействия. В частности, методом электрофореза ДНК в агарозном геле установлено, что фрагментация ДНК возрастала в Ф1 и МК при воздействии дексаметазона в концентрации 100 мкМ через 24 ч инкубации, но снижалась в Ф2. Более низкие концентрации дексаметазона (0,1 и 1 мкМ), напротив, снижали уровень апоптоза в МК, а в Ф2 – стимулировали апоптоз в обратной концентрационной зависимости. Это свидетельствует о более высокой чувствительности Ф2 к проапоптотическому действию дексаметазона по сравнению с Ф1. Вместе с тем, с увеличением времени инкубации до 48 ч дексаметазон оказывал апоптозстимулирующее действие во всех исследованных клетках и при всех концентрациях.

Известно, что АФК играют существенную роль в механизмах развития глюкокортикоидиндуцированного апоптоза иммунных клеток у позвоночных (Вольский и др., 1987), и, соответственно, уровень антиоксидантной ферментативной защиты определяет степень защиты клеток от апоптоза (Зенков и др., 1999). В связи с этим относительная резистентность иммуноцитов к проапоптотическому действию дексаметазона через 24 ч инкубации может быть связана со значительно более высокой антиоксидантной ферментативной активностью этих клеток, особенно Ф1, по сравнению с клетками позвоночных, как это было показано ранее (Dolmatova et al., 2003).

Установлено, что апоптозмодулирующее действие дексаметазона связано с его влиянием на антиоксидантную ферментативную систему клеток. Дексаметазон влиял на активность антиоксидантных ферментов (СОД, каталазы и ГР) в Ф1 в зависимости от концентрации и длительности воздействия. В частности, при 24-часовой инкубации наиболее значительное снижение активности исследованных ферментов отмечено при концентрации 100 мкМ, для которой был показан и выраженный проапоптотический эффект.

Кроме того, внесение коммерческой каталазы в среду инкубации Ф1 отменяло апоптотическое действие дексаметазона на фоне нормализации активности СОД и ГР. Эти данные свидетельствуют о важной роли антиоксидантных ферментов, прежде всего, каталазы, в защите от гормон-индуцированного апоптоза в Ф1, как это показано и в иммунных клетках позвоночных (Персиянова и др., 1998), и подтверждают предположение о высокой резистентности этих клеток к действию дексаметазона в связи с высоким уровнем в них активности антиоксидантных ферментов.

С другой стороны, в Ф2, менее резистентных к апоптотическому действию дексаметазона чем Ф1, и имеющих более низкий уровень базальной активности антиоксидантной ферментативной защиты по сравнению с Ф1 (Долматова и др., 2004), важная роль в механизмах апоптозмодулирующего действия дексаметазона, по-видимому, принадлежит ИЛ-1 α -ПВ. Так, воздействие дексаметазона (0,1; 1; 100 мкМ) на Ф2 в течение 24 ч приводило к обратному концентрационно-зависимому снижению уровня ИЛ-1 α -ПВ, что соответствует обратной концентрационной зависимости уровня апоптоза.

Впервые показано, что различные типы иммунных клеток голотурий *E. fraudatrix* (фагоциты двух фракций и морулоподобные клетки) могут взаимодействовать между собой на уровне гуморальных продуктов с передачей про- или антиапоптотических сигналов. Выявлен различный характер взаимодействия отдельных пар клеток. В частности, установлено, что Ф1 и МК оказывали друг на друга апоптозстимулирующее или апоптозингибирующее воздействие в зависимости как от времени инкубации гуморальных продуктов с клетками-мишенями, так и времени преинкубации клеток-продуцентов. При этом эффект зависел от уровня апоптоза как в клетках-продуцентах, так и в клетках-мишенях. При 30-минутной инкубации как сФ1-24, так и сМК24 с клетками-мишенями отмечено снижение уровня апоптоза. Длительная инкубация (24 ч) сМК24 с Ф1 не приводила к достоверному изменению уровня апоптоза в последних, а добавление сФ1-24 к МК - вызывало рост уровня апоптоза в клетках. Кроме того, действие сМК зависело от времени преинкубации: сМК3 оказывал проапоптотическое действие на Ф1.

Исследования показали также, что апоптозмодулирующее действие супернатанта МК на Ф1 осуществлялось через изменения активности антиоксидантных ферментов, при этом апоптоз развивался на фоне снижения антиоксидантной ферментной защиты, и

степень снижения активности ферментов, прежде всего, каталазы, напрямую зависела от времени инкубации, а высокий уровень каталазы, напротив, оказывал защитный антиапоптотический эффект. При воздействии сФ1 на МК, апоптоз развивался в МК на фоне повышения активности каталазы и снижения активности ГР, при этом не отмечено прямой зависимости изменений активности ферментов от времени инкубации.

Представленные данные, впервые показывают возможность взаиморегулирующего взаимодействия иммуноцитов беспозвоночных, в частности, голотурий, результат, которого зависит от времени взаимодействия. Представляется вероятным, что в паре Ф1 – МК, последние способны стимулировать функциональную активность Ф1 на ранней стадии иммунного ответа. На более поздней стадии Ф1 и МК либо не влияют, либо снижают функциональную активность друг друга. Такая взаиморегуляция, по-видимому, обеспечивает адекватность иммунного ответа без повреждения окружающих клеток и тканей АФК, продукция которых тесно связана с функциональной активностью фагоцитов, или цитотоксическими веществами, выделяемыми МК в процессе их активации.

Исследования цитокинопосредованных механизмов при взаимодействии Ф1 и МК показали, что, апоптоз в Ф1 при воздействии сМК24 происходил на фоне снижения в них уровня ИЛ-1 α -ПВ, а при инкубации МК с сФ1-24, уровень ИЛ-1 α -ПВ в МК сохранялся в пределах контрольного значения. Это указывает на различные механизмы сигналинга регуляции в двух типах клеток. Анализ изменений активности антиоксидантных ферментов и уровня ИЛ-1 α -ПВ во взаимодействующих клетках свидетельствует в пользу предположений о том, что в передаче апоптозмодулирующего сигнала от МК к Ф1 участвуют синтезируемые первыми ИЛ-1 α -ПВ, а в передаче сигнала от Ф1 к МК - перекись водорода. Участие обоих веществ в межклеточном сигналинге известно для позвоночных (Sabbione et al., 2013).

При исследовании воздействия сМК3 на Ф2, была выявлена сходная закономерность: супернатанты, полученные от МК с выраженным апоптозом, стимулировали апоптоз в Ф2 через 18 часов инкубации. Сопоставление результатов экспериментов по влиянию МК на фагоциты обоих типов выявляет однонаправленность эффектов МК в фагоцитах, что дает основание предполагать наличие сходства между их рецепторными и медиаторными аппаратами.

Однако, исследование цитокинзависимых механизмов влияния МК на Ф2 выявило, что, в отличие от Ф1, развитие апоптоза в Ф2 при 18-часовом воздействии сМКЗ происходило на фоне неизмененного по сравнению с контролем уровня ИЛ-1 α -ПВ. Таким образом, отмечено различие во включении механизмов передачи сигнала от МК к Ф2 и Ф1. Возможно, оно связано с различиями в исходном уровне ИЛ-1 α -ПВ и его регуляции в этих клетках, что подтверждается нашими данными о противоположном характере изменений этих веществ в двух типах фагоцитов при контрольной инкубации.

Вместе с тем, выявлено, что апоптозстимулирующий эффект сМКЗ на Ф2 сопровождался снижением активности каталазы, ГР и ГТ и ростом активности СОД. По-видимому, в МК во время 3-часовой преинкубации, образуются гуморальные вещества, которые при 18-часовом воздействии на Ф2 вызывают в последних рост уровня АФК, которые, в свою очередь, могут стимулировать рост уровня апоптоза и изменение активности антиоксидантных ферментов. Снижение активности ГР и ГТ в Ф2 может свидетельствовать о более быстром, чем в Ф1, истощении активности ГР и снижении запасов восстановленного глутатиона, связанными с исходно более низким уровнем ферментативной антиоксидантной защиты этих клеток по сравнению с Ф1.

Сходные механизмы апоптозстимулирующего действия МК в фагоцитах обоих типов, опосредованные снижением активности антиоксидантных ферментов, прежде всего каталазы, свидетельствует о том, что гуморальные вещества из МК стимулируют продукцию АФК в Ф2 и Ф1, и действие МК на Ф1 и Ф2 направлено на стимуляцию их функциональной активности в начальные сроки инкубации.

Установлено, что при влиянии, Ф2 на МК, сФ2-3 стимулировал в МК через 18 ч инкубации значительный рост апоптоза, на фоне снижения уровня ИЛ-1 α -ПВ и активности антиоксидантных ферментов (за исключением СОД). Это свидетельствует, по-видимому, об истощении ферментативной антиоксидантной защиты, уровень которой в МК исходно не высок по сравнению с фагоцитами (Долматова и др., 2004). Сравнение эффектов Ф1 и Ф2 на МК показывает, что оба типа фагоцитов могут модулировать активность МК посредством изменения уровня апоптоза, стимулируя его на фоне снижения активности антиоксидантных ферментов и уровня ИЛ-1 α -ПВ. При этом в обоих случаях в роли межклеточных медиаторов выступает, по-видимому, перекись водорода. Эти данные подтверждают наличие способности фагоцитов обоих типов к «респираторному взрыву». Об этом же свидетельствуют, полученные в экспериментах

по влиянию сФ2-24 на Ф1 данные, о подавлении гуморальными продуктами из Ф2 апоптоза, активности антиоксидантных ферментов и уровня ИЛ-1 α -ПВ в Ф1 по механизмам обратной связи. Полученные данные способствуют пониманию роли фагоцитов двух типов именно как фагоцитов, обладающих разным исходным уровнем продукции АФК, и, возможно, способных проявлять максимальную активность на разных стадиях иммунного ответа, о чем свидетельствует временная разница в изменениях синтеза ИЛ-1 α -ПВ в этих клетках при воздействии гуморальных продуктов других клеток.

Полученные результаты свидетельствуют также о наличии костимуляции между фагоцитами обоих типов и МК на ранних стадиях иммунного ответа, и взаимоограничениях - на более поздних, что, по-видимому, способствует предотвращению повреждения тканей организма при гиперпродукции токсичных веществ, выделяемых активированными клетками.

Исследование влияния дексаметазона, добавленного в среду преинкубации клеток-продуцетов, на взаимодействие клеток выявило различную направленность его эффектов при взаимодействии отдельных пар клеток. Так, добавление дексаметазона (100 мкМ) в среду 24-часовой преинкубации МК стимулировало апоптоз в Ф1 при последующем 24-часовом воздействии с(МК+Dex)24, по сравнению с сМК24. Стимуляция апоптоза наблюдалась также при воздействии на МК с(Ф1+Dex)24. Рост апоптоза в обоих случаях происходил на фоне снижения уровня ИЛ-1 α -ПВ в клетках-мишенях. Однако, если развитие апоптоза в Ф1 при воздействии с(МК+Dex)24 сопровождалось снижением активности каталазы и общего уровня антиоксидантной ферментной защиты, то в МК, обработанных с(Ф1+Dex)24, - на фоне роста активности каталазы, как и при воздействии сФ1-24.

Сходным образом, с(МК+Dex)3 стимулировал апоптоз в Ф2, через 18 ч инкубации. Однако с(Ф2+Dex)3, напротив, ингибировал апоптоз в МК. Причем, снижение происходило на фоне уменьшения концентрации ИЛ-1 α -ПВ. Такое ингибирующее действие с(Ф2+Dex)3, в отличие от с(Ф1+Dex)24, возможно, связано с разным сроком преинкубации двух типов фагоцитов. Однако, наиболее вероятно, что различия связаны с различной чувствительностью фагоцитов двух типов к дексаметазону, выявленной в предварительных опытах. Можно заключить, что снижение уровня апоптоза, вызываемое с(Ф2+Dex)3 и, напротив, его рост при

взаимодействии с(Ф1+Dex)24 с МК, сопровождались выделением фагоцитами антиапоптотических и проапоптотических продуктов, которые вызывали соответствующие эффекты в МК.

Антиапоптотическое действие с(Ф2+Dex) на МК не сопровождалось изменениями в активности СОД, но способствовало приближению активности каталазы к уровню контроля. При этом снижение активности ГР и рост активности ГТ, как и при воздействии на МК с(Ф1+Dex)24, свидетельствовали о сохранении пула восстановленного глутатиона в МК. По-видимому, антиоксидантная система, прежде всего, ее глутатионзависимое звено, защищало МК от развития апоптоза как при действии с(Ф2+Dex), так и с(Ф1+Dex).

Таким образом, сравнение эффектов влияния преинкубации дексаметазона с двумя типами фагоцитов на МК показывает, что эффект зависел от уровней апоптоза в клетках-продуцентах. Это подтверждено данными по влиянию с(Ф2+Dex)24 на Ф1, которые также демонстрируют снижение уровня апоптоза в Ф1 по сравнению с действием сФ2-24. Поскольку аналогичное антиапоптотическое действие с(Ф2+Dex)24 было показано в МК, в которых сФ2-24, напротив, повышал уровень апоптоза по сравнению с контролем, становится очевидным, что эффект гуморальных продуктов на клетки-мишени зависел от уровня апоптоза в клетках-продуцентах.

Дексаметазон оказался эффективным стимулятором апоптоза также в эксперименте *in vivo*. При введении интактным животным, он дозозависимо повышал уровень апоптоза в Ф1, а также оказывал модулирующий эффект при взаимодействии Ф1 с супернатантом МК по механизмам, сходным с таковыми при введении дексаметазона *in vitro*.

В целом, в настоящей работе показано, что отдельные типы иммунцитов в процессе взаимодействия на уровне гуморальных веществ оказывают друг на друга взаимостимулирующее или взаимоограничивающее действие, в зависимости от типа клеток и длительности их взаимодействия, а также исходного уровня функциональной активности клеток-мишеней. По-видимому, возможность взаимоограничения активности фагоцитов и МК обеспечивается наличием различных механизмов реализации влияния фагоцитов на МК (АФК как межклеточные медиаторы, выделяемые фагоцитами, и ИЛ-1 α -ПВ, и, возможно, другие цитокиноподобные вещества, как внутриклеточные медиаторы в МК) и, наоборот, МК - на фагоциты (внеклеточные

медиаторы, выделяемые МК - ИЛ-1 α -ПВ, а внутриклеточные –АФК). Кроме того, Ф2 также могут ограничивать функциональную активность Ф1, снижая в них уровень апоптоза. Все это указывает на наличие у голотурий развитой системы гуморальной регуляции иммунного ответа. Иммунные клетки продемонстрировали различную чувствительность к апоптозмодулирующему действию синтетического глюкокортикоидного гормона дексаметазона, которая и определяла эффект клеток-продуцентов, преинкубированных с дексаметазоном, на клетки-мишени. Дексаметазон, введенный *in vivo* и *in vitro*, оказывал на кооперацию Ф1 и МК сходное действие, что указывает на наличие прямого влияния дексаметазона на клетки иммунной системы и возможность экстраполяции данных, полученных в одной системе, на другую. Эффект дексаметазона на клетки был опосредован изменениями в редокс-системе клеток-мишеней, при этом активация антиоксидантной ферментной системы (прежде всего, каталазы - в фагоцитах, и глутатион-зависимых ферментов - в МК) защищала клетки от дексаметазониндуцированного апоптоза.

Установлено также преимущественно снижающее действие ИЛ-1 α -ПВ в иммунных клетках действие дексаметазона при развитии апоптоза, что свидетельствует также о наличии цитокинзависимых механизмов действия дексаметазона. Полученные результаты указывают на сходство механизмов реализации эффектов дексаметазона в иммунных клетках голотурии и позвоночных и свидетельствуют о преимущественно иммуносупрессивном действии дексаметазона. Вместе с тем, различная чувствительность фагоцитов двух типов к действию дексаметазона открывает возможности для варьирования иммунного ответа с целью выявления роли в нем отдельных типов фагоцитов.

Полученные результаты, наряду с известными ранее данными о наличии у иглокожих стероидных гормонов (Lafont, Mathieu, 2007), свидетельствуют также о значительно более высокой организации иммунитета голотурий, чем предполагалось ранее, и важной роли гормонов в ее регуляции. Эти данные вносят существенный вклад в понимание эволюции иммунной системы и могут быть использованы как в разработке лекционных курсов по исследованию иммунитета, 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 α -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 α -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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абелев Г.И. Взаимодействие врожденного и приобретенного иммунитета в защите организма от инфекции // Соросовский образовательный журнал. 1998. № 2. С. 53-58.
2. Агол В.И. Генетически запрограммированная смерть клетки // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 6. С. 20-24.
3. Артюхов В.Г., Трубицина М. С., Наквасина М. А., Соловьева Е. В., Фрагментация ДНК лимфоцитов человека в динамике развития апоптоза, индуцированного воздействием УФ-излучения и активных форм кислорода // Цитология. 2011. Т. 53, № 1. С. 61-67.
4. Беседнова Н.Н. Морские гидробионты – потенциальные источники лекарств // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014. № 3 (57). С. 4-10.
5. Бехало В.А., Сысолятина Е.В., Нагурская Е.В. Регуляция врожденного иммунного ответа в очаге хронического воспаления // Иммунология. 2009. № 3. С. 184-189.
6. Брудастов Ю.А., Журлов О.С., Колиниченко Е.В., Грудинин Д.А. Активные метаболиты кислорода при фагоцитозе // Вестник ОГУ. 2008. № 12. С. 148-151.
7. Вольский Н.Н., Козлов В.А., Лозовой В. П. Влияние гидрокортизона на продукцию супероксидного радикала фагоцитирующими клетками селезенки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1987. Т. 103, № 6. С. 694-696.
8. Галактионов В.Г. Генетический контроль взаимодействия иммунокомпетентных клеток // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 2. С. 28-34.
9. Гераськин И.В. Роль гемопротеинов в регуляции процессов пролиферации и апоптоза клеток // Наука молодых. 2017. № 4. С. 486-497.
10. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Клименко Н.А., Гумилевский Б.Ю., Богдашин И.В., Шерстобоев Е.Ю. Влияние тучных клеток на Т-лимфоцитарные механизмы регуляции гемопоза при воспалении // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1993. № 6. С. 602-604.
11. Гусев Е.Ю., Черешнев В.А. Эволюция воспаления // Цитокины и воспаление. 2012. Т. 11, № 4. С. 5–13.

12. Давтян Т.К., Геворкян Г.А., Погосян Д.А. Эволюция интегративной функции иммунной системы. 1. Эволюционное развитие иммунной системы. // Успехи современной биологии. 2005. Т. 125, № 1. С. 34-40.
13. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Д. Методы генетической инженерии // Генетика бактерий. М.: Мир. 1984. С. 108-113.
14. Долматов И.Ю., Бобровская Н.В., Гирич А.С. Иглокожие как модельные объекты для изучения механизмов регенерации // Вестник СПбГУ. 2014. Сер. 3, вып. 3. С. 96-112.
15. Долматова Л.С., Ромашина В.В., Дзуцев А.Х. Дозозависимое влияние морфина *in vitro* на апоптоз фагоцитов дальневосточной голотурии *Stichopus japonicus* // 10 Научно-практическая конференция неврологов «Нейроиммунология». 28-31 мая 2001 г. СПб. 2001. С. 69-70.
16. Долматова Л.С., Елисейкина М.Г., Ромашина В.В. Антиоксидантная ферментативная активность целомоцитов дальневосточной голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2004. Т. 40, № 2. С. 104-111.
17. Долматова Л.С., Заика О.А. Апоптозмодулирующее действие простагландина E₂ в целомоцитах голотурии *Eupentacta fraudatrix* зависит от антиоксидантного ферментативного статуса клеток // Известия РАН. Серия биологическая. 2007. № 3. С. 273 – 282.
18. Долматова Л.С., Заика О.А. Недашковская Е.П., Тимченко Н.Ф. Исследование механизмов апоптозмодулирующего влияния термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* и корректирующего действия экстракта из дальневосточных видов голотурий на нейтрофилы крыс *in vitro* // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 3. С. 76-80.
19. Долматова Л.С., Уланова О.А., Бынина М.П., Тимченко Н.Ф. Термостабильный токсин *Yersinia pseudotuberculosis* вызывает разнонаправленные изменения уровней маркеров функциональной активности двух типов фагоцитов у голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2017. Т. 70, № 3. С. 108-111.

20. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса // Вопросы медицинской химии. 2001. Т. 47, № 6. С. 561-581.
21. Дьяконов А.М., Баранова З.И., Савельева Т.С. Заметка о голотуриях (Holothurioidea) района Южного Сахалина и Южных Курильских островов // Исслед. дальневост. морей СССР. 1958. Вып. 5. С. 358-380.
22. Дьячков И.С., Кудрявцев И.В., Сухачев А.Н. Изучение механизмов межклеточной кооперации в реакциях врожденного иммунитета иглокожих // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2006. №3-1 (14). С. 57-60.
23. Дьячков И.С., Кудрявцев И.В. Анализ эффективности и механизмов кооперации клеточных реакций врожденного иммунитета у иглокожих // Российский иммунологический журнал. 2007. Т. 1 (10), № 1. С. 34-40.
24. Елисейкина М.Г., Магарламов Т.Ю. Морфология целомоцитов голотурий *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) и *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae) // Биология моря. 2002. Т. 28, № 3. С. 214-219.
25. Земсков А.М., Земсков В.М., Золоедов В.И., Жозовский Е.Б. Специфическая и неспецифическая иммунокоррекция // Успехи современной биологии. 1997. Т. 117, вып. 3. С. 261-268.
26. Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б., Вольский Н.Н., Козлов В.А. Внутриклеточный окислительный стресс и апоптоз // Успехи современной биологии. 1999. Т. 119, № 5. С. 440-450.
27. Исаева В.В., Коренбаум Е.С. Защитные функции целомоцитов и иммунитет иглокожих // Биология моря. 1989. № 6. С. 3-14.
28. Кадагидзе З.Г. Цитокины // Практическая онкология. 2003. Т. 4, № 3. С. 131-139.
29. Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Успехи биологической химии. 2014. Т. 54. С. 299-348.
30. Камбачокова З.А. Состояние процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у больных рецидивирующим генитальным герпесом // Журнал инфектологии. 2011. Т. 3, № 2. С. 63-67.

31. Клименко Н.А., Дыгай А.М., Богдашин И.В., Шерстобоев Е.Ю., Гольдберг Е.Д. Влияние тучных клеток на продукцию интерлейкина-1 макрофагами экссудата и костного мозга при воспалении // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1993. № 6. С. 599-600.
32. Ковалев Н.Н., Пивненко Т.Н., Ким Г.Н., Анализ рынка биологически активной продукции из промысловых голотурий (Echinodermata: Holothuroidea): сырье и технологии // Рыбное хозяйство. 2016. № 2. С. 112-116.
33. Коренбаум Е.С., Воробьев В.А. Клетки целомической жидкости морской звезды *Asterias amurensis* // Биология моря. 1988. № 1. С. 27-33.
34. Коренбаум Е.С. Ультраструктура целомцитов морской звезды *Asterias amurensis* // Цитология. 1989. Т. 31, № 10. С. 1165-1171.
35. Кудрявцев И.В., Злобина М.В. Иглокожие как модель изучения реакций врожденного иммунитета и ранних этапов эволюции каскада комплемента // Материалы научно-практической конференции и школы-семинара для молодых ученых с международным участием «Современные достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины». Астрахань-Москва. 2004. С. 96-101.
36. Кудрявцев И.В., Полевщиков А.В. Сравнительно-иммунологический анализ клеточных и гуморальных защитных факторов иглокожих // Журнал общей биологии. 2004. Т. 65, № 3. С. 223-236.
37. Кудрявцев И.В., Дьячков И.С., Казаков А.А., Канайкин Д.П., Харазова А.Д., Полевщиков А.В. Клеточные реакции врожденного иммунитета морской звезды *Asterias rubens* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2005. Т. 41, № 2. С. 107-113.
38. Кудрявцев И.В., Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Черешнев В.А. Современные методы оценки функций фагоцитов в экспериментальной биологии // Российский иммунологический журнал. 2012. Т. 6, № 3. С. 3-20.
39. Ламаш Н.Е. Гормональная регуляция мейоза у морских звезд // Биология моря. 2002. Т. 28, № 6. С. 395-404.
40. Магарламов Т.Ю. Целомоциты иглокожих и их роль в защитных реакциях: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток: ИБМ ДВО РАН. 2004. 26 с.
41. Малышева Е.В., Круглов С.В., Назаров В.А., Манухина Е.Б., Малышев И.Ю. Внутриклеточный и внеклеточный NO дифференциально модулирует стресс-ответ и апоптоз в макрофагах, подвергнутых воздействию биологических или физических

факторов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. Т. 143, № 6. С. 614-618.

42. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии // Молекулярное клонирование. М.: Мир. 1984. С. 157-175.

43. Матвеева Н.Ю. Апоптоз: морфологические особенности и молекулярные механизмы // Тихоокеанский медицинский журнал. 2003. № 4. С. 12-16.

44. Маянский А.Н., Маянский Н.А., Заславская М.И., Поздеев Н.М., Плескова С.Н. Апоптоз нейтрофилов // Иммунология. 1999. № 6. С.11-20.

45. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К. Окислительный стресс при воспалении // Успехи современной биологии. 1997. Т. 117, № 2. С. 155-157.

46. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово. 2006. 556 с.

47. Меркулов В.М., Климова Н.В., Меркулова Т.И. Рецептор глюкокортикоидов: переход из цитоплазмы в клеточное ядро, хроматиновый и внутриядерный шапероновый циклы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015. Т. 19, № 3. С. 255-263.

48. Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев И.Ю. M1 и M2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии // Патогенез. 2008. Т. 6, № 4. С. 31-39.

49. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Часовских Н.Ю., Старикова Е.Г., Кайгородова Е.В., Стариков Ю.В., Жукова О.Б. Модуляция апоптоза мононуклеаров в условиях окислительного стресса // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008. № 3. С. 251-254.

50. Одинцова Н.А. Основы культивирования клеток морских беспозвоночных. Владивосток: Дальнаука. 2001. 162 с.

51. Певницкий Л.А. Программированная гибель клеток и апоптоз: значение для развития и функционирования иммунной системы // Вестник РАМН. 1996. № 6. С. 44-50.

52. Персиянова В.О., Вольский Н.Н., Гребенщиков А.Ю., Козлов В.А. Участие активированных кислородных метаболитов в индуцированном глюкокортикоидами апоптозе тимоцитов мыши // Иммунология. 1998. № 5. С. 44-46.

53. Персиянова В.О. НАДФН-оксидазная активность клеток иммунной системы и ее роль в глюкокортикоид-зависимом апоптозе тимоцитов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Новосибирск: ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН. 2003. 15 с.

54. Персиянова В.О., Вольский Н.Н. Сдвиг баланса $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$ потенцирует апоптоз тимоцитов, вызванный глюкокортикоидами // Материалы 6-й отчетной конференции ГУ НИИКИ СО РАМН. Новосибирск. 2003. С. 136-138.

55. Плетюшкина О.Ю., Фетисова Е.К., Лямзаев К.Г., Иванова О.Ю., Домнина Л.В., Высоких М.Ю., Пустовидко А.В., Алексеевский А.В., Алексеевский Д.А., Васильев Ю.М. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке // Биохимия. 2006. Т. 71, № 1. С. 75-84.

56. Подгорная О.И., Исаева В.В. Тромбообразовательная функция клеток-морул целомической жидкости морского ежа // Биология моря. 1985. № 5. С. 26-31.

57. Подколзин А.А., Мегреладзе А.Г., Донцов В.И., Арутюнов С.Д., Мрикаева О.М., Жукова Е.А. Система антиоксидантной защиты организма и старение // Профилактика старения. 2000. Вып. 3. С. 37-55.

58. Полетаева А.В., Леванюк А.И., Сергеева Е.В. Влияние гормонов на иммунологическую реактивность // Экология человека. 2009. № 7. Стр. 42-46.

59. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. 2002. № 4. С. 237-243.

60. Робинсон М.В., Труфакин В.А. Апоптоз клеток иммунной системы // Успехи современной биологии. 1991. Т. 111, № 2. С. 246-259.

61. Руднева И.И. Эколого-физиологические особенности антиоксидантной системы рыб и процессов перекисного окисления липидов // Успехи современной биологии. 2003. Т. 123, № 4. С. 391-400.

62. Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Часовских Н.Ю., Кайгородова Е.В., Старикова Е.Г., Стариков Ю.В. Редокс-зависимая регуляция апоптоза: адаптивная роль активных форм кислорода при окислительном стрессе. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2008. Т. 94, № 6. С. 710-718.

63. Сергеев П.В. Стероидные гормоны. М.: Наука. 1984. 240 с.

64. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир. 1985. 342 с.

65. Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воротников А.В. Пероксид водорода как новый вторичный посредник // Биологические мембраны. 2012. Т. 29, № 1-2. С. 21-37.
66. Тодосенко Н.М., Королева Ю.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Литвинова Л.С. Геномные и негеномные эффекты глюкокортикоидов // Гены и клетки. 2017. Т. 12, № 1. С. 27-33.
67. Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. СПб.: Наука. 2000. 231 с.
68. Физиология человека. Под ред. В.М. Покровского, Г.Ф. Коротько. 1997. М.: Медицина. Т. 1. 448 с.
69. Фонталин Л.Н. Происхождение антигенраспознающей иммунной системы позвоночных. Молекулярно-биологические и иммунологические аспекты // Иммунология. 1998. № 5. С. 33-44.
70. Фрейдлин И.С. Цитокины и межклеточные контакты в противоинфекционной защите // Соросовский образовательный журнал. 1996. № 7. С. 20-25.
71. Хвощевская М.Ф., Дубовский И.М., Глупов В.В. Изменение активности супероксиддисмутазы в разных органах личинок большой вощиной огневки (*Galleria mellonella* L., Lepidoptera: Pyralidae) при заражении *Bacillus thuringiensis* ssp. *Galleriae* // Известия РАН. Серия биологическая. 2005. № 1. С. 63-68.
72. Цыган В.Н. Роль апоптоза в регуляции иммунного ответа // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2004. Т. 3, № 2. С. 62-66.
73. Чечина О.Е., Биктасова А.К., Сазонова Е.В., Жукова О.Б., Прохоренко Т.С., Крат И.В., Часовских Н.Ю., Новицкий В.В., Рязанцева Н.В. Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза // Бюллетень сибирской медицины. 2009. № 2. С. 67-72.
74. Шапорова Н.Л., Трофимов В.И., Мнускина М.М., Сесь Т.П., Дудина О.В. Роль глюкокортикоидных гормонов в развитии аллергического воспаления // Аллергология 2000. № 4. С. 13-17.
75. Шарова Н.И., Дзуцев А.Х., Литвина М.М., Харченко Т.Ю., Ярилин А.А. Результаты взаимодействия лимфоидных и эпителиальных клеток тимуса человека *in vitro*. Активация и апоптоз // Иммунология. 2000. № 3. С. 7-12.

76. Широкова А.В. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки // Цитология. 2007. Т. 49, №5. С.385-394.
77. Юсупова Л.Б. О повышении точности определения активности глутатионредуктазы эритроцитов // Лабораторное дело. 1989. № 4. С. 19-21.
78. Ярилин А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах // Иммунология. 1996. № 6. С. 10-23.
79. Ярилин А.А. Межклеточная кооперация при иммунном ответе. Выбор клеткой формы ответа // Иммунология. 1999. № 1. С 17-24.
80. Aebi H. Catalase. In: Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press. 1974. Vol. 2. P. 673-683.
81. Alabdullah H.A., Fox L.K., Gay J.M., Barrington G.M., Mealey R.H. Effects of dexamethasone and *Mycoplasma bovis* on bovine neutrophil function in vitro // Vet Immunol Immunopathol. 2015. Vol. 164. P. 67-73.
82. Anderson S.L., Singh B. Neutrophil apoptosis is delayed in an equine model of colitis: Implications for the development of systemic inflammatory response syndrome // Equine Vet J. 2017. Vol. 49, no. 3. P. 383-388.
83. Aquiloni L., Giulianini P. G., Mosco A., Guarnaccia C., Ferrero E., Gherardi F. Crustacean hyperglycemic hormone (cHH) as a modulator of aggression in Crustacean Decapods // PLOS ONE. 2012. Vol. 7, no. 11. P. 1-7.
84. Arizza V., Giaramita F., Parrinello D., Cammarata M., Parrinello N. Cell cooperation in coelomocyte cytotoxic activity of *Paracentrotus lividus* coelomocytes // Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. 2007. Vol. 147. P. 389-394.
85. Bal N., Kumar A., Du J., Nugegoda D. Multigenerational effects of two glucocorticoids (prednisolone and dexamethasone) on life-history parameters of crustacean *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) // Environ Pollut. 2017. Vol. 225. P. 569-578.
86. Ballarin L., Franchini A., Ottaviani E., Sabbadin A. Morula cells as the major immunomodulatory hemocytes in ascidians: evidences from the colonial species *Botryllus schlosseri* // Biological Bulletin. 2001. Vol. 201. P. 59-64.
87. Baran, J.,K. Guzik, W. Hryniewicz, M. Ernst, Flad H.D., Pryjma J. Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. Infect. Immun. 1996. Vol. 64. P. 4242-4248.

88. Barcia R., Ramos-Martinez J.I. Effect of interleukin-2 on nitric oxide production in molluscan innate immunity // *Invertebrate Survival Journal*. 2008. Vol. 5. P. 43-49.
89. Bearer B.E., Hahn W.C. T-cell adhesion, avidity regulation and signaling: a molecular analysis of CD2 // *Seminars in Immunology*. 1993. Vol. 5. P. 249-261.
90. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Analytical biochemistry*. 1971. Vol. 44, no 1. P. 276-287.
91. Bebianno M.J., Company R., Serafim A., Camus L., Cosson R.P., Fiala-Medoni A. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields // *Aquatic Toxicology*. 2005. Vol. 75. P. 354-373.
92. Beck G. Macrokinines: invertebrate cytokine-like molecules? // *Frontiers in bioscience*. 1998. Vol. 3. P. 559-569.
93. Beck G., Habicht G. Invertebrate cytokines // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994. Vol. 712, no. 1. P. 206-212.
94. Beck G., Ellis T. Zhang H., Lin W., Beauregard K., Habicht G.S., Truong N. Nitric oxide production by coelomocytes of *Asterias forbesi* // *Developmental and Comparative Immunology*. 2001. Vol. 25. P. 1-10.
95. Bertheussen K., Seljelid R. Echinoid phagocytes in vitro // *Experimental Cell Research*. 1978. Vol. 111, no. 2. P. 401-412.
96. Beschin A., Bilej M., Torreale E., Baetselier P. On the existence of cytokines in invertebrates // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2001. Vol. 58. P. 801-814.
97. Bhat R.S., Bhaskaran M., Mongia A., Hitosugi N., Singhal P. C. Morphine-induced macrophage apoptosis: oxidative stress and strategies for modulation // *Journal of Leukocyte Biology*. 2004. Vol. 75. P. 1131-1138.
98. Bhattacharyya S.P., Drucker I., Reshef T., Kirshenbaum A.S., Metcalfe D. D., Mekori Y.A. Activated T lymphocytes induced degranulation and cytokine production by human mast cells following cell-to-cell contact // *Journal of Leukocyte Biology*. 1998. Vol. 63. P. 337-341.
99. Bhattacharjee R., Xiang W., Wang Y., Zhang X., Billiar T.R. c AMP prevents TNF-induced apoptosis through inhibiting DISC complex // *Biochemical Biophysical Research Communications*. 2012. Vol. 423. P. 85-90.
100. Blagosklonny M.V. P53: An ubiquitous target of anticancer drugs // *International Journal of Cancer*. 2002. Vol. 98. P. 161-166.

101. Bloom J., Chacko J., Lohman I., Halonen M., Martinez F., Miesfeld R. Differential control of eosinophil survival by glucocorticoids // *Apoptosis*. 2004. Vol. 9, no. 1. P. 97-104.
102. Bounous G., Molson J.H. The antioxidant system // *Anticancer research*. 2003. Vol. 23. P. 1411-1416.
103. Böttger S., Jerszyk E., Low B., Walker C. Genotoxic stress-induced expression of p53 and apoptosis in leukemic clam hemocytes with cytoplasmically sequestered p53 // *Cancer Research*. 2008. Vol. 68. P. 777-782.
104. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Analytical Biochemistry*. 1976. Vol. 72. P. 248-254.
105. Bragado P., Armesilla A., Silva A., Porras A. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38 alpha MAPK activation through ROS generation // *Apoptosis*. 2007. Vol. 12. P. 1733-1742.
106. Byrne M. The ultrastructure of the morula cells of *Eupentacta quinquesemita* (Echinodermata: Holothuroidea) and their role in the maintenance of the extracellular matrix // *Journal of Morphology*. 1986. Vol. 188. P. 179-189.
107. Callard R., George A. J.T., Stark J. Cytokines, chaos, and complexity // *Immunity*. 2003. Vol. 11. P. 507-513.
108. Canicatti C., D'Ancona G., Farina-Lipari E. The coelomocytes of *Holothuria polii* (Echinodermata). I. Light and electron microscopy // *Boll. Zool.* 1989. Vol. 56, no. 1. P. 29-36.
109. Chantong B., Kratschmar D.V., Nashev L.G., Balazz Z., Odermatt A. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors differentially regulate NF-kappaB activity and pro-inflammatory cytokine production in murine BV-2 microglial cells // *Neuroinflammation*. 2012. Vol. 9. doi: 10.1186/1742-2094-9-260.
110. Chia F., Xing J. Echinoderm coelomocytes // *Zoological Studies*. 1996. Vol. 35, no. 4. P. 231-254.
111. Chiou S.K., Rao L., White E. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis // *Molecular and Cellular Biology*. 1994. Vol. 14, no. 4. P. 2556-2563.

112. Claman H.N., Chaperon E.A., Triplett R.F. Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production // Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1966. Vol. 122, no. 4. P. 1167-1171.
113. Clarke A.R., Purdie C.A., Harrison D.J., Morris R.G., Bird C.C., Hooper M. L., Wyllie A.H. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathway // Nature. 1993. Vol. 362. P. 849-852.
114. Clow L., Raftos D., Gross P., Smith L. The sea urchin complement homologue, SpC3, function as an opsonin // The Journal of Experimental Biology. 2004. Vol. 207. P. 2147-2155.
115. Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products // Blood. 1992. Vol. 80, no. 8. P. 2012-2020.
116. Corcoran A., Cotter T.G. Redox regulation of protein kinases // FEBS Journal. 2013. Vol. 280. P. 1944-1965.
117. Costantini C., Calzetti F., Perbellini O. et al. Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc⁺ DC and NK cells to amplify NK-derived IFN γ : role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3 // Blood. 2011. Vol. 117. P. 1677-1686.
118. Cottrell G.A., Green K.A., Davies N.W. The neuropeptide Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRFamide) can activate a ligand-gated ion channel in Helix neurones // Pflugers Archiv – European Journal of Physiology. 1990. Vol. 416. P. 612-614.
119. Curi T., Demelo M., Palanca A., Miyasaka C., Curi R. Percentage of phagocytosis, production of O₂⁻, H₂O₂ and NO₂ and antioxidant enzyme activities of rat neutrophils in culture // Cell Biochemistry and Function. 1998. Vol. 16. P. 43-48.
120. Dalpke A., Heeg K., Bartz H., Baetz A. Regulation of innate immunity by suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins // Immunobiology. 2008. Vol. 213. P. 225-235.
121. DangLi R., HeKong W., JiQin L., MingHua Z., WenCheng Z. ROS-induced ZNF580 expression: a key role for H₂O₂/NF- κ B signaling pathway in vascular endothelial inflammation // Molecular and Cellular Biochemistry. 2012. Vol. 359. P. 183-191.
122. Davis W., Ronai Z., Tew K. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2001. Vol. 296, no. 1. P. 1-6.

123. De Bosscher K., Vanden Berghe W., Vermeulen L., Plaisance S., Boone E., Haegeman G. Glucocorticoids repress NF-kB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000. Vol. 97. P. 3919-3924.

124. Delves P.J., Martin D.J., Burton D.R., Roitt I.M. Roitt's essential immunology. 11 th ed. Oxford: Blackwell Science. 2006. 474 p.

125. Deroo B.J., Archer T.K. Glucocorticoid receptor activation of the I kappa B alpha promoter within chromatin // Molecular Biology of the Cell. 2001. Vol. 12. P. 3365-3374.

126. Dickey-Sims C., Robertson A., Rupp D., McCarthy J., Coffman J. Runx-dependent expression of PKS is critical for cell survival in the sea urchin embryo // BMC Biology. 2005. Vol. 3. P. 18-31.

127. Dolmatova L.S., Eliseykina M.G., Timchenko N.F., Kovaleva A.L., Shitkova O. A. Generation of reactive oxygen species in different fractions of the coelomocytes of holothurian *Eupentacta fraudatrix* in response to the thermostable toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* in vitro // Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 2003. Vol. 21, no. 4. P. 293-304.

128. Dolmatova L.S., Zaika O.A., Romashina V.V. Cytokine production in coelomocytes of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* and seastar *Asterias amurensis* // PICES 17th Annual Meeting «Beyond observations to achieving understanding and forecasting in a changing North Pacific: Forward to the Future», Oct.24-Nov.2, 2008, Dalian. China. Dalian. 2008. P. 63.

129. Dolmatova L.S., Zaika O.A. Comparative effects of PGE2 on different types of immune cells in holothurian *Eupentacta fraudatrix*. In Goodwin G. M., Ed., Cell Biology Research Progress. Prostaglandins: Biochemistry, functions, types and roles. Nova Science Publishers. New York. 2010. P. 47-64.

130. Dolmatova L., Zaika O., Slinko E., Kolosova L. Antioxidant enzyme defense and heavy metal accumulation in tissues of holothurians *Apostichopus japonicus* and *Eupentacta fraudatrix*: characteristics of body-length dependences during spring-summer period // Pacific oceanography. 2010. Vol. 5, no. 1. P. 96-105.

131. Dong Y.W., Dong S.L., Ji T.T. Effect of different thermal regimes on growth and physiological performance of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka // *Aquaculture*. 2008. Vol. 275. P. 329-334.
132. Edds K.T. Differential distribution and function of microtubules and microfilaments in sea urchin coelomocytes // *Cell Motility*. 1984. Vol. 4, no. 4. P. 269-281.
133. Edds K.T. Cell biology of echinoid coelomocytes. I. Diversity and characterization of cell types // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1993. Vol. 61. P. 173-178.
134. Endean R. The coelomocytes and coelomic fluid. In: Boolootian RA (ed), *Physiology of Echinodermata*. New York: Acad. Press. 1966. P. 301-328.
135. Ernst J.D., Stendahl O. *Phagocytosis of bacterial pathogenicity*. New York: Cambridge University Press. 2006. 285 p.
136. Ezeamuzie C.I., Taslim N. Reactive oxygen species mediate phorbol ester-stimulated cAMP response in human eosinophils // *European Journal of Pharmacology*. 2006. Vol. 543. P. 174-180.
137. Fan T., Han L., Cong R., Liang J. Caspase family proteases and apoptosis // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2005. Vol. 37, no. 11. P. 719-727.
138. Fontaine A.R., Lambert P. The fine structure of the haemocyte of the holothurian, *Cucumaria miniata* (Brandt) // *Can. J. Zool.* 1973. Vol. 51. P. 323-332.
139. Fraternali A., Brundu S., Magnani M. Polarization and repolarization of macrophages // *J. Clin. Cell. Immunol.* 2015. Vol. 6. P. 2-12.
140. Galasso C., D'Aniello S., Sansone C., Ianora A., Romano G. Identification of Cell Death Genes in Sea Urchin *Paracentrotus lividus* and Their Expression Patterns during Embryonic Development // *Genome Biol. Evol.* 2019. Vol. 11, no. 2. P. 586-596.
141. Gallo K.A., Johnson G.L. Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002. Vol. 3, no. 9. P.663-672.
142. Gascoyne D.M., Kypka R.M., Vivanco M.M. Glucocorticoids inhibit apoptosis during fibrosarcoma development by transcriptionally activating Bcl-xL // *The Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278. P. 18022-18029.
143. Gerschenson L.E., Rotello R.J. Apoptosis: a different type of cell death // *The FASEB Journal*. 1992. Vol. 6. P. 2450-2455.
144. Giavarotti L., Simon K.A., Azzalis L.A., Fonseca F.L., Lima A.F., Freitas M.C., Brunialti M.K., Salomão R., Moscardi A.A., Montañó M.B., Ramos L.R., Junqueira V.B. Mild

systemic oxidative stress in the subclinical stage of Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, Article ID 609019. doi: 10.1155/2013/609019.

145. Gold R., Schmied M., Tontsch U., Hartung H. P., Wekerle H., Toyka K. V., Lassmann H. Antigen presentation by astrocytes primes rat T lymphocytes for apoptotic cell death. A model for T-cell apoptosis in vivo // *Brain*. 1996. Vol. 119. P. 651-659.

146. Greenstein S., Ghias K., Krett N.L., Rosen T. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies // *Clinical Cancer Research*. 2002. Vol. 8. P. 1681-1694.

147. Grimmelikhuijzen C.J.P., Hauser F. Mini-review: The evolution of neuropeptide signaling // *Regulatory Peptides*. 2012. Vol. 177. P. 56-59.

148. Gross P.S., Clow L. A., Smith L.C. SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes // *Immunogenetics*. 2000. Vol. 51. P. 1034-1044.

149. Gu M., Ma H., Mai K., Zhang W., Ai Q., Wang X., Bai N. Immune response of sea cucumber *Apostichopus japonicus* coelomocytes to several immunostimulants *in vitro* // *Aquaculture*. 2010. Vol. 306. P. 49-56.

150. Gurst J.E., Sheikh Y.M., Djerassi C. Synthesis of corticosteroids from marine sources // *J. American Chemical Society*. 1973. Vol. 95, no. 2. P. 628-629.

151. Habig W.H., Pabst M. J., Jakoby W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // *The Journal of Biological Chemistry*. 1974. Vol. 249, no. 22. P. 7130-7139.

152. Hacker G. The morphology of apoptosis // *Cell and Tissue Research*. 2000. Vol. 301. P. 5-17.

153. Hannah S., Mecklenburgh K., Rahman I., Bellingan G.J., Greening A., Haslett C., Chilvers E. R. Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro // *FEBS Lett*. 1995. Vol. 372 (2-3). P. 233-237.

154. He C., Carter A.B. The metabolic prospective and redox regulation of macrophage polarization // *J. Clin. Cell. Immunol*. 2015. Vol. 6. e371.

155. Heck S., Kullmann M., Gast A., Ponta H., Rahmsdorf H. J., Herrlich P., Cato A. C. A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1 // *The EMBO Journal*. 1994. Vol. 13. P. 4087-4095.

156. Heck S., Bender K., Kullmann M., Gottlicher M., Herrlich P., Cato A.C. I kappa B alpha-independent downregulation of NF-kappa B activity by glucocorticoid receptor // *The EMBO Journal*. 1997. Vol. 16. P. 4698-4707.
157. Hengartner MO. Programmed cell death in invertebrates // *Current Opinion in Genetics and Development*. 1996. Vol. 6, no. 1. P. 34-38.
158. Herold M.J., McPherson K.G., Reichardt H.M. Glucocorticoids in T cell apoptosis and function // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006. Vol. 63. P. 60-72.
159. Heyland A., Reitzen A.M., Hodin J. Thyroid hormones determine developmental mode in sand dollars (Echinodermata: Echinoidea) // *Evolution and Development*. 2004. Vol. 6, no. 6. P. 382-392.
160. Heyland A., Plachetzki D., Donnelly E., Gunaratne D., Bobkova Y., Jacobson J., Kohn A.B., Moroz L.L. Distinct expression patterns of glycoprotein hormone subunits in the lophotrochozoan *Aplysia*: implications for the evolution of neuroendocrine systems in animals // *Endocrinology*. 2012. Vol. 153, no. 11. P. 5440-5451.
161. Hildeman D.A., Mitchell T., Aronow B., Wojciechowski S., Kappler J., Marrack P. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species // *PNAS*. 2003. Vol. 100, no. 25. P. 15035-15040.
162. Hines G.A., Watts S.A., Sower S.A., Walker C.W. Sex steroid levels in the testes, ovaries and pyloric caeca during gametogenesis in the sea star *Asterias vulgaris* // *General and Comparative Endocrinology*. 1992. Vol. 87, no. 3. P. 451-460.
163. Ho P.K., Hawkins C.J. Mammalian initiator apoptotic caspases // *FEBS J*. 2005. Vol. 272. P. 5436-5453.
164. Hobaus E. Coelomocytes in normal and pathological altered body wall of sea urchin // *Echinoderms: present and past*. Rotterdam. 1980. P. 247-249.
165. Holmblad T., Soderhall K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity // *Aquaculture*. 1999. Vol. 172, no. 1-2. P. 111-123.
166. Ivanina A.V., Sokolova I.M., Sukhotin A.A. Oxidative stress and expression of chaperones in aging mollusks // *Comparative and Biochemical Physiology B: Biochemical and Molecular Biology*. 2008. Vol. 150, no. 1. P. 53-61.
167. Janeway C.A. How the immune system protects the host from infection // *Microbes Infection*. 2001. Vol. 3. P. 1167-1171.

168. Jaramillo M.C., Frye J.B., Crapo J.D., Briehl M.M., Tome M.E. Increased manganese superoxide dismutase expression or treatment with a manganese porphyrin potentiates dexamethasone-induced apoptosis in lymphoma cells // *Cancer Research*. 2009. Vol. 69. P. 5450-5457.
169. Jeong C., Joo S. Downregulation of reactive oxygen species in apoptosis // *J Cancer Prev*. 2016. Vol. 21, no. 1. P. 13–20.
170. Johnson P.T. The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*). I. The normal coelomocytes, their morphology and dynamics in hanging drops // *Journal of Invertebrate Pathology*. 1969. Vol. 13. P. 25-41.
171. Kalim K.W., Groettrup M. Prostaglandin E2 inhibits IL-23 and IL-12 production by human monocytes through down-regulation of their common p40 subunit // *Molecular Immunology*. 2013. Vol. 53. P. 274-282.
172. Kamyab E., Kühnhold H., Novais S., Alves L., Indriana L., Kunzmann A., Slater M., Lemos M. Effects of thermal stress on the immune and oxidative stress responses of juvenile sea cucumber *Holothuria scabra* // *J Comp. Physiol. B*. 2017. Vol. 187, no. 1. P. 51-61.
173. Kasamatsu J., Evolution of innate and adaptive immune systems in jawless vertebrates // *Microbiol Immunol*. 2013. Vol. 57., no. 1. P. 1-12.
174. Kaufmann S. H., Earnshaw W. C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy // *Experimental Cell Research*. 2000. Vol. 256. P. 42-49.
175. Kaufmann T., Schlipf S., Sanz J., Neubert K., Stein R., Borner C. Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane // *The Journal of Cell Biology*. 2003. Vol. 160. P. 53-64.
176. Kooten C. van, Banchereau J. CD40-CD40 ligand: a multifunctional receptor-ligand pair // *Advances in Immunology*. 1996. Vol. 61. P. 1-77.
177. Kolamunne R.T., Dias I.H., Vernallis A.B., Grant M.M., Griffiths H.R. Nrf2 activation supports cell survival during hypoxia and hypoxia/reoxygenation in cardiomyoblasts; the roles of reactive oxygen and nitrogen species // *Redox Biol*. 2013. Vol. 1(1). P. 418-426.
178. Kraaij M.D., der Kooij S.W., Reinders M.E., Koekkoek K., Rabelink T.J., van Kooten C., Gelderman K.A. Dexamethasone increases ROS production and T cell suppressive

capacity by anti-inflammatory macrophages // *Molecular Immunology*. 2011. Vol. 49. P. 549-557.

179. Kumar S., Doumanis J. The fly caspases // *Cell Death and Differentiation*. 2000. Vol. 7. P. 1039-1044.

180. Kurtz J. Memory in the innate and adaptive immune systems // *Microbes and Infections*. 2004. Vol. 6. P. 1410-1417.

181. Lacoste A., Cueff A., Poulet S.A. P35-sensitive caspases, MAP kinases and Rho modulate beta-adrenergic induction of apoptosis in mollusc immune cell // *Journal of Cell Science*. 2002. Vol. 115. P. 761-768.

182. Lafont R., Mathieu M. Steroids in aquatic invertebrates // *Ecotoxicology*. 2007. Vol. 16. P. 109-130.

183. Lecal L. Etude des coelomocytes d'un Crinoïde, description de *Cryptobia antedona*, n.sp., Zooflagelle Bodonide du coelome general d'*Antedon bifida* (Pennant). In: Jangoux M. J (ed) *Echinoderms: present and past. Proc. European Colloquium on Echinoderms*, Brussels, 3-8 September 1979. Balkema, Rotterdam. 1980. P. 271-275.

184. Leclerc M, Bajelan M. Effect of hydrocortisone on the axial organ of the sea star *Asterias rubens* // *Thymus*. 1991. Vol. 17, no. 4. P. 253-256.

185. Lee R.F., Glutathione S-transferase in marine invertebrates from Langesundfjord // *Marine ecology. Progress series*. 1988. V. 46, no. 1-3. P. 33-36.

186. Legas E., Vaugier G. L., Bousquet F., Bajelan M., Leclerc M. Primitive cytokines and cytokine receptors in invertebrates: the sea star *Asterias rubens* as a model of study // *Scandinavian Journal of Immunology*. 1996. Vol. 44. P. 375-380.

187. Lenschow D.L., Walunas T.L., Bluestone J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation // *Annual Review of Immunology*. 1996. Vol. 14. P. 233-258.

188. Liao W.Y., Fugmann S.D. Lectins identify distinct populations of coelomocytes in *Strongylocentrotus purpuratus* // *PLoS One*. 2017. e0187987.

189. Liles W.C., Dale D.C., Klebanoff S.J. Glucocorticoids inhibit apoptosis of human neutrophils // *Blood*. 1995. Vol. 86. P. 3181-3188.

190. Limbourg F.P., Huang Z., Plumier J.C., Simoncini T., Fujioka M., Tuckermann J., Schutz G., Moskowitz M.A., Liso J.K. Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids // *Journal of Clinical investigation*. 2002. Vol. 110. P. 1729-1738.

191. Lindsay J., Lyons R.B., Bacon R.L. Separation of sea urchin coelomocyte types by centrifugation // *American Zoologist*. 1972. Vol. 15. P. 645.
192. Liu Y., Tan J.S., Bao Z.M., Xie J.L. Ultrastructural study on coelomocyte of *Apostichopus japonicas* // *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*. 2005. Vol. 24. P. 613-615.
193. Madge L.A., Pober J.S. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkappaB in human endothelial cells // *The Journal of Biological Chemistry*. 2000. Vol. 275, no. 20 P. 15458–15465.
194. Malagoli D. Cytokine network in invertebrates: the very next phase of comparative immunology // *Invertebrate survival journal*. 2010. Vol. 7. P. 146-148.
195. Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., Evans R.M. The nuclear receptor superfamily: the second decade // *Cell*. 1995. Vol. 83. P. 835-839.
196. Mann C.L., Hughes F.M., Cidlowski J.A. Delineation of the signaling pathways involved in glucocorticoid-induced and spontaneous apoptosis of rat thymocytes // *Endocrinology*. 2000. Vol. 141. P. 528-538.
197. Maria A., Filosto S., Scudiero R., Rinaldi A. M., Roccheri M.C. Cadmium accumulation induced apoptosis in *P. Lividus* embryos // *Caryologia*. 2006. Vol. 59, no. 4. P. 403-408.
198. McAllister C.S., Lakhdari O., Pineton de Chambrun G., Gareau M. G., Broquet A. Lee G.H., Shenouda S., Eckmann L., Kagnoff M.F. TLR3, TRIF, and caspase 8 determine double-stranded RNA-induced epithelial cell death and survival in vivo // *The Journal of Immunology*. 2012. Vol. 190. P. 418-427.
199. Mejía-García T.A., Portugal C.C., Encarnação T.G., Prado M.A., Paes-de-Carvalho R. Nitric oxide regulates AKT phosphorylation and nuclear translocation in cultured retinal cells // *Cell Signal*. 2013. Vol. 25 (12). P. 2424-2439. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.08.001.
200. Memon S.A., Moreno M.B., Petrak D., Zacharchuk C.M. Bcl-2 blocks glucocorticoid- but not Fas- or activation-induced apoptosis in a T cell hybridoma // *The Journal of Immunology*. 1995. Vol. 155. P. 4644-4652.

201. Meng H., Marchese M.J., Garlick J.A., Jelaska A., Korn J.H., Gailit J., Clark R.A., Gruber B.L. Mast cells induce T-cell adhesion to human fibroblasts by regulating intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 expression // *Journal of Investigative Dermatology*. 1995. Vol. 105, no. 6. P. 789-796.
202. Messer L.I., Wardlaw A.C. Separation of the coelomocytes of *Echinus esculentus* by density gradient centrifugation. In: Jangoux M. J. (ed) *Echinoderms: present and past*. Proc. European Colloquium on Echinoderms, Brussels, 3-8 September 1979. Balkema, Rotterdam. 1980. P. 319-323.
203. Mita M., Oka H., Thorndyke M. C., Shibata Y., Yoshikuni M., Nagahama Y. Inhibitory effect of a SALMamide neuropeptide on secretion of gonad-stimulating substance from radial nerves in the starfish *Asterina pectinifera* // *Zoological Science*. 2004. Vol. 21, no. 3. P. 299-303.
204. Mosier D.E., Coppelson L.W. A three-cell interaction required for the induction of the primary immune response in vitro // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1968. Vol. 61, no. 2. P. 542-547.
205. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation // *Nature Reviews Immunology*. 2008. Vol. 8(12). P. 958-969.
206. Muroya M., Chang K., Uchida K., Bougaki M., Yamada Y. Analysis of cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines in the human alveolar epithelial cell line A549 // *Bioscience Trends*. 2012. Vol 6. P. 70-80.
207. Naderi E.H., Ugland H.K., Diep P.P., Josefsen D., Ruud E., Naderi S., Blomhoff H.K. Selective inhibition of cell death in malignant vs normal B-cell precursors: implications for cAMP in development and treatment of BCP-ALL // *Blood*. 2013. Vol. 121, no. 10. P. 1805-1813.
208. Nakano N., Nishiyama C., Yagita H., Koyanagi A., Akiba H., Chiba S., Ogawa H., Okumura K. Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells // *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2009. Vol. 123, no. 1. P. 74-81.
209. Nguyen H.X., Tidball J.G. Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells *in vitro* // *The Journal of Physiology*. 2002. Vol. 547, no. 1. P. 125-132.

210. Nie Z., Deng S., Zhang L., Chen S., Lu Q., Peng H. Crocin protects against dexamethasone-induced osteoblast apoptosis by inhibiting the ROS/Ca²⁺-mediated mitochondrial pathway // *Mol Med Rep*. 2019. Vol. 20, no. 1. P. 401-408.
211. Nocentini G., Giunchi L., Ronchetti S., Krausz L. T., Bartoli A., Moraca R. Migliorati G., Riccardi C. A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptors-induced apoptosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997. Vol. 94. P. 6216-6221.
212. Ottaviani E., Franchini A., Caselgrandi E., Genedani S. Cytokines and invertebrate immune response // *Biology of the Cell*. 1995. Vol. 85. P. 87-91.
213. Ottaviani E., Malagoli D., Franchini A. Invertebrate humoral factors: cytokines as mediators of cell survival // *Progress in Molecular the Subcellular Biology*. 2004. Vol. 34. P. 1-25.
214. Ottaviani E. Molluscan immunorecognition // *Invertebrate Survival Journal*. 2006. Vol. 3. P. 50-63.
215. Padgett L.E., Broniowska K.A., Hansen P.A., Corbett J.A., Tse H. M. The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type I diabetes pathogenesis // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013. Vol. 1281. P. 16-35.
216. Pagliara P., Canicatti C. Isolation of cutolitic granules from sea urchin amoebocytes // *Eur. J. Cell. Biol*. 1993. Vol. 60, no. 1. P. 179-184.
217. Pasmanik M., Izhar M., Zolti M., Shemesh M. Dexamethasone inhibition of prostaglandin production in human term placental cells is protein and ribonucleic acid synthesis dependent // *Endocrinology*. 1991. Vol. 128, no. 4. P. 2058-2064.
218. Pastore A., Piemonte F. S-Glutationylation signaling in cell biology: progress and prospects // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012. Vol. 46. P. 279-292.
219. Patel R.P., Moellering D., Murphy-Ullrich J., Jo H., Beckman J.S., Darley-Usmar V. M. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis // *Free Radical Biology and Medicine*. 2000. Vol. 28, no. 12. P. 1780-1794.
220. Persijanova V.O., Volsky N.N., Kozlov V.A. Glucocorticoids increase NADPH oxidase activity in cell-free system // 27th Scand. Soc. Immunol. Meet. Turku May 24-27 1996 Abstracts. 1996. P. 731.
221. Phagocytes: biology, physiology, pathology and pharmacotherapeutics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1997. V. 832. 450 p.

222. Pires K.M.P., Lanzetti M., Rueff-Barroso C.R., Castro P., Abrahao A., Koatz V. L.G., Valenca S.S., Porto L.C. Oxidative damage in alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract and participation of nitric oxide in redox balance // *Toxicology in Vitro*. 2012. Vol. 26. P. 791-798.
223. Pirger Z., Nemeth J., Hiripi L., Toth G., Kiss P., Lubics A., Tamas A., Hernadi L., Kiss T., Reglodi D. PACAP has anti-apoptotic effect in the salivary gland of an invertebrate species, *Helix pomatia* // *Journal of Molecular Neuroscience*. 2008. Vol. 36. P. 105-114.
224. Phillips H.J. Dye exclusion tests for cell viability //In: *Tissue Culture: Methods and Applications*. Academic. Press, New York. 1973. P. 406-408.
225. Popov S.S., Shulgin K. K., Popova T. N. et al. Effects of melatoninaided therapy on the glutathione antioxidant system activity and liver protection // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2015. Vol. 29, no. 10. P. 449–457.
226. Pollack A., Ciancio G. Cell cycle phase specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after Ethanol preservation // *Methods in Cell Biology*. 1990. Vol. 33. P. 19-24.
227. Pramanick D., Forstova J., Pivec L. 4 M guanidine hydrochloride applied to the isolation of DNA from different sources // *FEBS Letters*. 1976. Vol. 62, no. 1. P. 81-84.
228. Pratt W.B., Gehring U., Toft D.O. Molecular chaperoning of steroid hormone receptors // *EXS*. 1996. Vol. 11. P. 79-95.
229. Raftos D.A., Cooper E.L., Habicht G.S., Beck G. Invertebrate cytokines: tunicate cell proliferation stimulated by an interleukin 1-like molecule // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991. Vol. 88. P. 9518-9522.
230. Ramirez-Gomez F., Garcia-Arraras J.E. Echinoderm immunity // *ISJ*. 2010. Vol. 7. P. 211-220.
231. Rast J.P., Messier-Solek C. Marine invertebrate genome sequences and our evolving understanding of animal immunity // *Biol. Bull*. 2008. V. 214. P. 274-283.
232. Regoli F., Hummel H., Amiard-Triquet C., Larroux C., Sukhotin A. Trace metals and variations of antioxidant enzymes in Arctic bivalve populations // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1998. Vol. 35, no. 4. P. 594-601.

233. Reichardt H.M., Kaestner K.H., Tuckermann J., Kretz O., Wessely O., Bock R., Gass P., Schmid W., Herrlich P., Angel P., Schulz G. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival // *Cell*. 1998. Vol. 93. P. 531-541.
234. Rejendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami R., Gnanadhas EN., Lakshminarasaiah U., Gopas J., Nishigaki I. Antioxidants and human diseases // *Clin. Chim. Acta*. 2014. Vol. 436. P. 332-347.
235. Riera-Romo M., Perez-Martinez D., Castillo Ferrer C. Innate immunity in vertebrates: an overview // *Immunology*. 2016. Vol. 148, no. 2. P. 125-139.
236. Robertson A.J., Croce J., Carbonneau S., Voronina E., Miranda E., McClay D.R., Coffman J.A. The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus* // *Developmental Biology*. 2006. Vol. 300. P. 321-334.
237. Roccheri M.C., Barbata G., Cardinale F., Tipa C., Bosco L., Oliva O.A., Cascino D., Giudice G. Apoptosis in sea urchin embryos // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997. Vol. 240, no. 2. P. 359-366.
238. Roccheri M.C., Tipa C., Bonaventura R., Matranga V. Physiological and induced apoptosis in sea urchin larvae undergoing metamorphosis // *International Journal of Developmental Biology*. 2002. Vol. 46, no. 6. P. 801-806.
239. Romero A., Estevez-Calvar N., Dios S., Figueras A., Novoa B. New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis* // *PloS ONE*. 2011. Vol. 6, no. 2. P. 1-15.
240. Rowe M. L., Achhala, S., Elphick, M. Neuropeptides and polypeptide hormones in echinoderms: new insights from analysis of the transcriptome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus* // *Gen. Comp. Endocrinol*. 2014. Vol. 197. P. 43-55.
241. Sabbione F., Gabelloni M. L., Ernst G., Gori M.S., Salamone G., Oleastro M., Trevani A., Geffner J., Jancic C.C. Neutrophils suppress $\gamma\delta$ T-cell function // *European Journal of Immunology*. 2013. doi: 10.1002/eji.201343664.
242. Sagar S., Parida S., Sabnam S., Rizwan H., Pal S., Swain M., Pal A. Increasing NO level regulates apoptosis and inflammation in macrophages after 2-chloroethyl ethyl sulphide challenge // *Int J Biochem Cell Biol*. 2017. Vol. 83. P. 1-14.
243. Saint-Denis M., Labrot F., Narbonn J.F., Ribera D. Glutathione, glutathionerelated enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenin fetida andrei* // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1998. V. 35. P. 602-614.

244. Samchenko I.I., Sirota V.V., Kiroshka V.V., Bondarenko T.P. Dose-dependent effect of ovalbumin and dexamethasone on the degree of allergic inflammation in guinea-pigs // The Journal of V. N. Kharkiv National University. Series: biology. 2010. Vol. 11, no. 905. P. 201-205.
245. Sandstrom P.A., Buttke T.M. Autocrine production of extracellular catalase prevents apoptosis of the human CEM T-cell line in serum-free medium // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993. Vol. 90. P. 4708-4712.
246. Santiago P., Roig-Lopez J. L., Santiago C. Garcia-Arraras J.E. // Serum amyloid A protein in an echinoderm: its primary structure and expression during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima* // Journal of Experimental Zoology. 2000. Vol. 288, no. 4. P. 335-344.
247. Schmidt S., Rainer J., Pioner C., Presul E., Rimi S., Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance // Cell death and differentiation. 2004. Vol. 11. P. S45-S46.
248. Semmens D.C., Elphick M.R. The evolution of neuropeptide signalling: insights from echinoderms // Brief Funct Genomics. 2017. Vol. 16, no. 5. P. 288-298.
249. Shalini S., Dorstyn L., Dawar S., S Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases // Cell Death Differ. 2015. Vol. 22, no. 4. P. 526–539.
250. Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease // J. Cell Physiol. 2018. Vol. 233. P. 6425-6440.
251. Shatwell K.P., Segal A.W. NADPH oxidase // The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 1996. Vol. 28, no. 11. P. 1191-1195.
252. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas // The Journal of Clinical Investigation. 2012. Vol. 122, no. 3. P. 787-795.
253. Singh A.K., Haldar C. Melatonin modulates glucocorticoid receptor mediated inhibition of antioxidant response and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells // Molecular and Cellular Endocrinology. 2016. Vol. 436. P. 59-67.
254. Siva-Jothy M.T. Trauma, disease and collateral damage: Conflict in cimicids // Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences. 2006. Vol. 361. P. 269-275.

255. Smiley S. *Holothuroidea // Microscopic anatomy of invertebrates*. New York: Wiley-Liss. 1994. Vol. 14. 510 p.
256. Smith V.J., *The Echinoderms // Invertebrate blood cells*. London: Academic Press. 1981. P. 513-562.
257. Sodergren E., Weinstock G.M., Davidson E.H., Cameron R.A., Gibbs R.A., Angerer R. C., Angerer L. M., Armone M. I., Burgess D. R., Burke R. D., et al. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* // *Science*. 2006. Vol. 314. P. 941-952.
258. Sokolova I.M., Evans S., Hughes F.M. Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition // *The Journal of Experimental Biology*. 2004. Vol. 207. P. 3369-3380.
259. Sokolova I.M. Apoptosis in molluscan immune defense // *Invertebrate Survival Journal*. 2009. Vol. 6. P. 49-58.
260. Sparks C., Marnewick J., Toefy R., Snyman R., Odendaal J. Baseline levels of antioxidant activities in *Mytilus galloprovincialis* along the coast of Cape Town, South Africa // *Mar Pollut Bull*. 2019. Vol. 140. P. 287-293.
261. Sunila I., LaBanca J. Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* // *Diseases of Aquatic Organisms*. 2003. Vol. 56. P. 163-170.
262. Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor // *Nature*. 1999. Vol. 397. P. 441-446.
263. Tedesco S., Bolego C., Toniolo A. et al. Phenotypic activation and pharmacological outcomes of spontaneously differentiated human monocyte-derived macrophages // *Immunobiology*. 2015. Vol. 220, no. 5. P. 545-554.
264. Terahara K., Takahashi K. G. Mechanisms and immunological roles of apoptosis in molluscs // *Current Pharmaceutical Design*. 2008. Vol. 14. P. 131-137.
265. Torres R.C., Batista M.M., Pons A.H., Silva A.R., Cordeiro R.S., Martins M.A., Silva P.M., Carvalho V.F. Activation of PRAR γ by restores mast cell numbers and reactivity in alloxan-diabetic rats by reducing the systemic glucocorticoid levels // *European Journal Pharmacology*. 2012. Vol. 691. P. 261-267.

266. Tschischka K., Abele D., Portner H.O. Mitochondrial oxyconformity and cold adaptation in the polychaeta *Nereis pelagica* and the bivalve *Arctica islandica* from the Baltic and White seas // *Journal of Experimental Zoology*. 2000. V. 203. P. 3355-3368.
267. Turner MD., Nedjai B., Hurst T., Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease // *Biochim Biophys Acta*. 2014. Vol. 1843, no. 11. P. 2563-2582.
268. Vega R.L., Epel D. Stress-induced apoptosis in sea urchin embryogenesis // *Marine Environmental Research*. 2004. Vol. 58. P. 799-802.
269. Vega Thurber R., Epel D. Apoptosis in early development of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus* // *Developmental Biology*. 2007. Vol. 303. P. 336-346.
270. Veis D.J., Sorenson C.M., Shutter J.R., Korsmeyer S.J. Bcl-2- deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair // *Cell*. 1993. Vol. 75. P. 229-240.
271. Volsky N.N., Persijanova V.O., Kozlov V.A. Membrane NADPH oxidase and normal regulation of the immunocompetent cell functional activity // *Russian Journal of Immunology*. 2001. Vol. 6, no. 2. P. 148-156.
272. Voogt P.A., den Besten P.J., Kusters G.C., Messing M.W. Effects of cadmium and zinc on steroid metabolism and steroid level in the sea star *Asterias rubens* L. // *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology and Pharmacology*. 1987. Vol. 86, no. 1. P. 83-89.
273. Voronina E., Wessel G.M. Apoptosis in sea urchin oocytes, eggs and early embryos // *Molecular Reproduction and Development*. 2001. Vol. 60. P. 553-561.
274. Xing J., Chia F.S. Opsonin-like molecule found in coelomic fluid of a sea cucumber, *Holothuria leucospilota* // *Marine biology*. 2000. Vol. 136. P. 979-986.
275. Xing K., Yang H.S., Chen M.Y. Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus* // *Aquatic Biology*. 2008. Vol. 2. P. 85-92.
276. Xing K., Gu B., Zhang P., Wu X. Dexamethasone enhances programmed cell death 1 (PD-1) expression during T cell activation: an insight into the optimum application of glucocorticoids in anti-cancer therapy // *BMC Immunol*. 2015. Vol. 26. P. 16-39.
277. Wang Z., Yang H., Ramesh A., Roberts L., J., Zhou L., Lin X., Zhao Y., Guo Z. Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/ or catalase accelerates benzo (α) pyrene

detoxification by upregulation of the aryl hydrocarbon receptor in mouse endothelial cells // *Free Radical Biology and Medicine*. 2009. P. 1221-1229.

278. Wang S., He G., Chen M., Zuo T., Xu W., Liu X. The role of antioxidant enzymes in the ovaries // *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2017. Vol. 2017. e4371714.

279. Wasson K.M., Gower B.A., Hines G.A., Watts S.A. Levels of progesterone, testosterone, and estradiol, and androstenedione metabolism in the gonads of *Lytechinus variegatus* (Echinodermata:echinoidea) // *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2000. Vol. 126, no. 2. P. 153-165.

280. Willoughby R., Pomponi S. Detection of apoptosis in cells of mature marine invertebrates // *Molecular Biology of the Cell*. 1999. Vol. 10. P. 2632.

281. Yamamoto K.R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks // *Annual Review of Genetics*. 1985. Vol. 19. P. 209-252.

282. Yang M., Yuan P., Li P., Chen A., Li S., Hu C. Interferon regulatory factor 4 binding protein is a novel p53 target gene and suppresses cisplatin-induced apoptosis of breast cancer cells // *Molecular Cancer*. 2012. Vol. 11. P. 54.

283. Yim J.Y., Yang S.J., Yim J.M., Song M.Y., Rho H.W., Yim S.K., Han Y.H., Jeon S.Y., Kim H.S., Yhim H.Y., Lee N.R., Song E.K., Kwak J.Y., Sohn M.N., Yim C.Y. Lymphocyte-mediated macrophage apoptosis during IL-12 stimulation. *Cytokine*. 2013. Vol. 64(1). P. 62-70. doi: 10.1016/j.cyto.2013.07.027.

284. Yuce O., Sadler K. C. Postmeiotic unfertilized starfish eggs die by apoptosis // *Developmental Biology*. 2001. Vol. 237. P. 29-44.

285. Zhang Z., Lv Z., Wei Z., Li C., Shao Y., Zhang W., Zhao X., Xiong J. Microsomal glutathione transferase 2 modulates LTC₄ synthesis and ROS production in *Apostichopus japonicus* // *Molecular Immunology*. 2017. Vol. 91. P. 114-122.

286. Zaugg M., Jamali N.Z., Luccinetti E., Xu W., Alam M., Shafiq S. A., Siddiqui M. A.Q. Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes // *Journal of Cellular Physiology*. 2001. Vol. 187, no. 1. P. 90-95.

287. Zen M., Canova M. Campana C., Bettio S., Nalotto L., Rampudda M., Ramonda R., Laccarino L., Doria A. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system // *Autoimmunity reviews*. 2011. Vol. 10. P. 305-310.

288. Zeng W., Wang X., Xu P., Liu G., Eden H., Chen X. Molecular Imaging of Apoptosis: From Micro to Macro // *Theranostics*. 2015. Vol. 5, no. 6. P. 559–582.
289. Zhao L., Ren C., Chen T., Sun H., Wu X., Jiang X., Huang W. The first cloned sea cucumber fadd from *Holothuria leucospilota*: molecular characterization, inducible expression and involvement of apoptosis // *Fish Shellfish Immunol*. 2019. Vol. 89. P. 548-554.
290. Zhou Q., Bucher C., Munger M.E., Highfill S.L., Tolar J., Munn D.H., Levine B. L., Riddle M., June C.H., Vallera D.A., Weigel B.J., Blazar B.R. Depletion of endogenous tumor-associated regulatory T cells improves the efficacy of adoptive cytotoxic T-cell immunotherapy in murine acute myeloid leukemia // *Blood*. 2009. Vol. 114. P. 3793-3802.