

## ВЛИЯНИЕ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОДУКТОВ МОДУЛЯРНЫХ КЛЕТОК НА ФАГОЦИТЫ ГОЛОТУРИИ *EUPENTACTA FRAUDATRIX* (DJAKONOV ET VARANOVA, 1958) (SCLERODACTYLIDAE: DENDROCHIROTIDA)

© 2019 г. О. А. Уланова<sup>1</sup>, \*, Л. С. Долматова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН, Владивосток 690041, Россия

\*e-mail: olga\_shitkova@mail.ru

Поступила в редакцию 26.06.2018 г.

После доработки 11.09.2018 г.

Принята к публикации 18.10.2018 г.

Исследовано влияние гуморальных продуктов модулярных клеток (МК) на уровень апоптоза, концентрацию цитокиноподобных веществ и экспрессию поверхностных рецепторов к растительным лектинам из *Arachis hypogaea*, *Glycine max* и к конканавалину А (Кон А) в фагоцитах двух типов (Ф1 и Ф2) голотурии *Eupentacta fraudatrix* (Djakonov et Varanova, 1958). Показано, что супернатант МК вызывал в Ф1 снижение уровня апоптоза и концентрации интерлейкин-1 $\alpha$ -подобных веществ (ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ), а в Ф2, напротив, их увеличение. По-видимому, увеличение концентрации ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ стимулирует апоптоз в Ф2 голотурии *E. fraudatrix* при воздействии супернатанта МК. Противоположное изменение уровня апоптоза в фагоцитах двух типов при воздействии супернатанта МК зависит от экспрессии разных рецепторов: в Ф1 задействованы рецепторы с углеводными остатками N-ацетил-D-галактозамина и  $\beta$ -D-галактозы, а в Ф2 —  $\alpha$ -D-маннозы. Полученные данные свидетельствуют о разной роли фагоцитов Ф1 и Ф2 в иммунном ответе. Разный уровень связывания лектинов с поверхностными рецепторами Ф1 и Ф2 указывает на различия в их рецепторном аппарате и на возможность использования определения связывания лектинов с клетками для фенотипирования этих иммунных клеток.

**Ключевые слова:** взаимодействие клеток, фагоциты, модулярные клетки, иммунитет голотурий, апоптоз, лектины

**DOI:** 10.1134/S0134347519040107

Морские гидробионты представляют значительный интерес не только как пищевые объекты, но и как источники получения биологически активных веществ (Беседнова, 2014). В то же время из-за постоянного контакта с другими организмами, в частности с болезнетворными бактериями, морские гидробионты подвержены заболеваниям и гибели (Долматова и др., 2017). В этой связи важно изучать иммунитет данных животных и возможности его регуляции.

Голотурия *Eupentacta fraudatrix* (Holothuroidea: Echinodermata) является обычным обитателем шельфа Японского моря, это удобный модельный объект для исследования врожденного иммунитета. Однако к настоящему времени механизмы иммунитета у голотурий недостаточно изучены. Известно, что иглокожие, в том числе голотурии, занимают особое место среди беспозвоночных, так как находятся в основании древа Deuterostomia, к которому относятся и позвоночные, их иммунная система представляет собой сложно организованную морфофункциональную структуру (Кудрявцев и др., 2005). Ключевую

роль в иммунных реакциях голотурий играют фагоциты и модулярные клетки (МК) (Chia, Xing, 1996). Фагоциты подобно макрофагам позвоночных захватывают и инкапсулируют антигены. Модулярные клетки участвуют в инкапсуляции чужеродных микроорганизмов, в заживлении ран и регенерации (Chia, Xing, 1996). Центрифугирование целомической жидкости голотурии *E. fraudatrix* в градиенте плотности фикола-верографина позволило выделить два типа фагоцитов (Ф1 и Ф2) с разной функциональной активностью (Долматова и др., 2004).

У позвоночных животных иммунный ответ осуществляется при взаимодействии клеток и может координироваться гуморальными продуктами (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Среди гуморальных регуляторов иммунного ответа у позвоночных важную роль играют лектины и цитокины. Лектины — это белки, обладающие свойством специфично и обратимо связывать углеводы и их остатки в биополимерах. Лектины способны влиять на межклеточную кооперацию и реализацию программируемой клеточной смерти (апоптоз)

(Рапопорт и др., 2010). Одним из перспективных методологических подходов в клеточной биологии и иммунологии является использование растительных лектинов (Сухачев и др., 2009). Так, растительные лектины, в частности конканавалин А (Кон А), часто используются для модуляции иммунного ответа в эксперименте (Павловская, Гагарина, 2017). Лектины тесно связаны с функциональной активностью иммунных клеток, что находит применение в исследованиях врожденного иммунитета у различных представителей беспозвоночных (Сухачев и др., 2009). Известно, что повышение уровня цитокинов запускает апоптоз (Чечина и др., 2009). Причем по данным ряда авторов на продукцию цитокиноподобных веществ иммунными морских гидробионтов могут влиять лектины (Запорожец и др., 2004; Черников и др., 2007). Иммунные клетки голотурий различаются по уровню апоптоза, концентрации цитокиноподобных веществ, в частности интерлейкин-1 $\alpha$ -подобных веществ (ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ), а также по уровню связывания растительных лектинов рецепторами на поверхности клеток (Долматова и др., 2006). У голотурий показана возможность взаимодействия между иммунными на гуморальном уровне (Zaika, Dolmatova, 2013; Долматова, Уланова, 2014). Однако данных о взаимодействии иммунных клеток голотурии *E. fraudatrix* недостаточно.

В связи с этим целью настоящей работы заключалась в исследовании влияния секреторных продуктов модулярных клеток на уровень апоптоза, концентрацию ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ и на связывание растительных лектинов поверхностными рецепторами двух типов фагоцитов голотурии *E. fraudatrix*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Особей *Eupentacta fraudatrix* (длина тела 35–65 мм) собирали в зал. Петра Великого Японского моря. До начала экспериментов в течение 2–4 нед. животных содержали в аквариуме с проточной аэрируемой морской водой. Голотурий надрезали скальпелем, целомическую жидкость отбирали и добавляли к антикоагулирующему раствору в соотношении 1 : 2 по объему (Chia, Xing, 1996). Фракции, обогащенные МК, Ф1 и Ф2, получали центрифугированием образцов в ступенчатом градиенте фикола-верографина. Полученные клетки отмывали фосфатно-солевым буфером с добавлением NaCl, pH 7.6 (ФСБН) (Zaika, Dolmatova, 2013). Культивирование иммунных клеток проводили в среде 199, дополнительно содержащей на 1 л 16.41 г NaCl, 0.264 г KCl, 0.87 г CaCl<sub>2</sub>, 4.98 г MgCl<sub>2</sub>, 3.87 г MgSO<sub>4</sub>, 22.74 г глицина, 0.1 г глюкозы, 2.5 г бычьего сывороточного альбумина и 50 мг гентамицина (модификация метода: Одинцова, 2001).

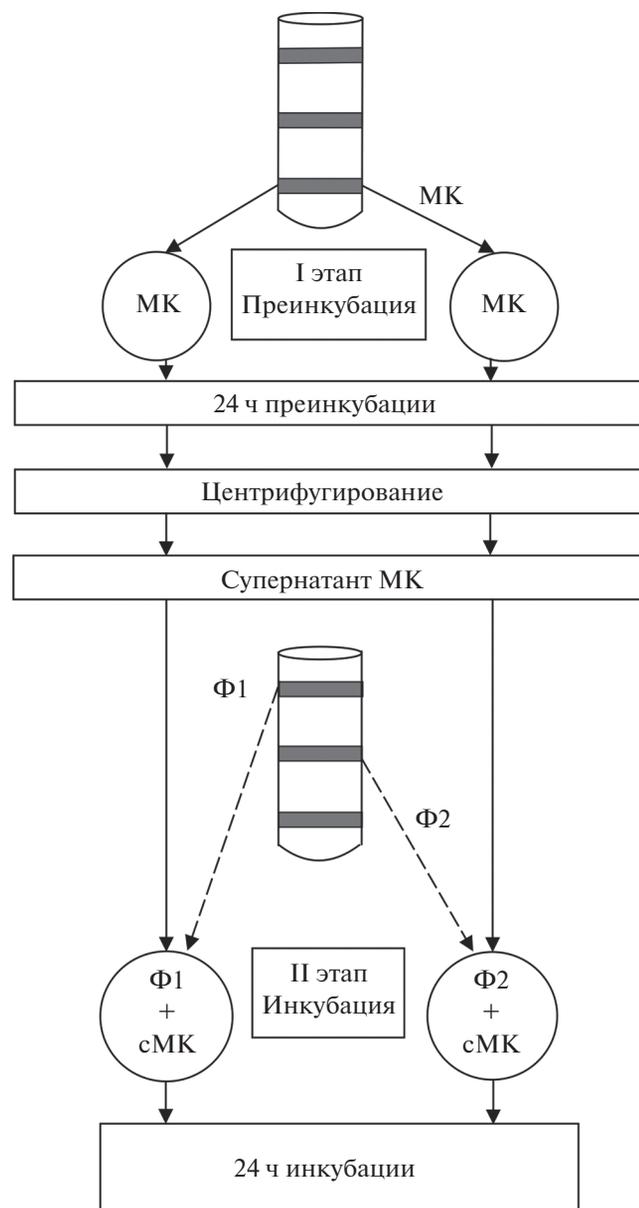
Взаимодействие МК с фагоцитами Ф1 или Ф2 исследовали в два этапа (рис. 1). Эксперимент проводили в трех повторностях; всего было использовано 40 животных. Инкубацию осуществляли в круглодонных планшетах при температуре 22°C. На первом этапе (преинкубация) МК инкубировали в течение 24 ч. По окончании преинкубации суспензии МК центрифугировали при 300 g в течение 15 мин при 5°C и получали супернатанты (сМК). На втором этапе (инкубация) полученные супернатанты добавляли к свежесделанным суспензиям фагоцитов Ф1 или Ф2 (1 млн клеток/1 мл) в соотношении 1 : 1 по объему. Контролем являлись Ф1 и Ф2, к которым добавляли ФСБН. Инкубацию проводили в течение 24 ч. Определяли экспрессию поверхностных рецепторов клеток к лектинам, долю апоптотических клеток по окраске ядер Hoechst 33342 и концентрацию ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ.

Для определения экспрессии поверхностных рецепторов клеток к лектинам часть суспензии центрифугировали при 300 g в течение 15 мин при температуре 5°C; осадок фиксировали 4% раствором глутаральдегида (McKenzie, Preston, 1992). В работе использовали растительные лектины, конъюгированные с флуоресцеином изотиоцианатом (FITC), конканавалин А (коммерческий маннозоспецифичный лектин, Кон А) (ICN, США), лектины из арахиса *Arachis hypogaea* (галактозосвязывающий лектин) (ICN, США) и сои *Glycine max* (лектин, связывающий N-гликозидные цепи) (ICN, США), а также ядерный краситель DAPI (Sigma, США). Клетки в окрашенных мазках (не менее 150 в образце) подсчитывали под микроскопом Leica DM4500 P (Германия) при увеличении  $\times 200$ . Об уровне экспрессии судили по процентному содержанию ярко-зеленых флуоресцирующих клеток. Долю ядер клеток, окрашенных DAPI, оценивали по процентному содержанию ярко-голубых флуоресцирующих клеток.

Для определения апоптоза часть суспензии центрифугировали при 300 g в течение 15 мин при 5°C; осадок фиксировали 4% раствором формалина. Затем материал отмывали ФСБН от фиксатора и окрашивали Hoechst 33342 (ICN, США) (Pollack, Ciancio, 1990). Клетки в окрашенных мазках (не менее 150 в образце) подсчитывали под микроскопом Leica DM4500 P при увеличении  $\times 200$ . Об уровне апоптоза судили по процентному содержанию ярко-голубых флуоресцирующих клеток.

Для определения концентрации ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ клетки разбивали ультразвуком (УЗДН-1, Россия) 22 кГц 100 с (5 раз по 20 с). Для получения безядерного супернатанта образцы центрифугировали при 1000 g в течение 6 мин. В безядерных супер-

## РЕЗУЛЬТАТЫ



**Рис. 1.** Схема эксперимента. МК – морулярные клетки, сМК – супернатант МК; Ф1, Ф2 – фагоциты.

натантах определяли концентрацию ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ, используя наборы для иммуноферментного анализа содержания интерлейкина-1 $\alpha$  (“Цитокин”, Санкт-Петербург). Концентрацию белка в пробах определяли с помощью окраски Кумасси-G250 (Bradford, 1976).

Полученные данные (среднее значение  $\pm$  средняя ошибка измерений) анализировали с использованием непарного  $t$ -теста (программное обеспечение INSTAT-3, GraphPad Software). Разницу между группами считали достоверной при  $p < 0.05$ .

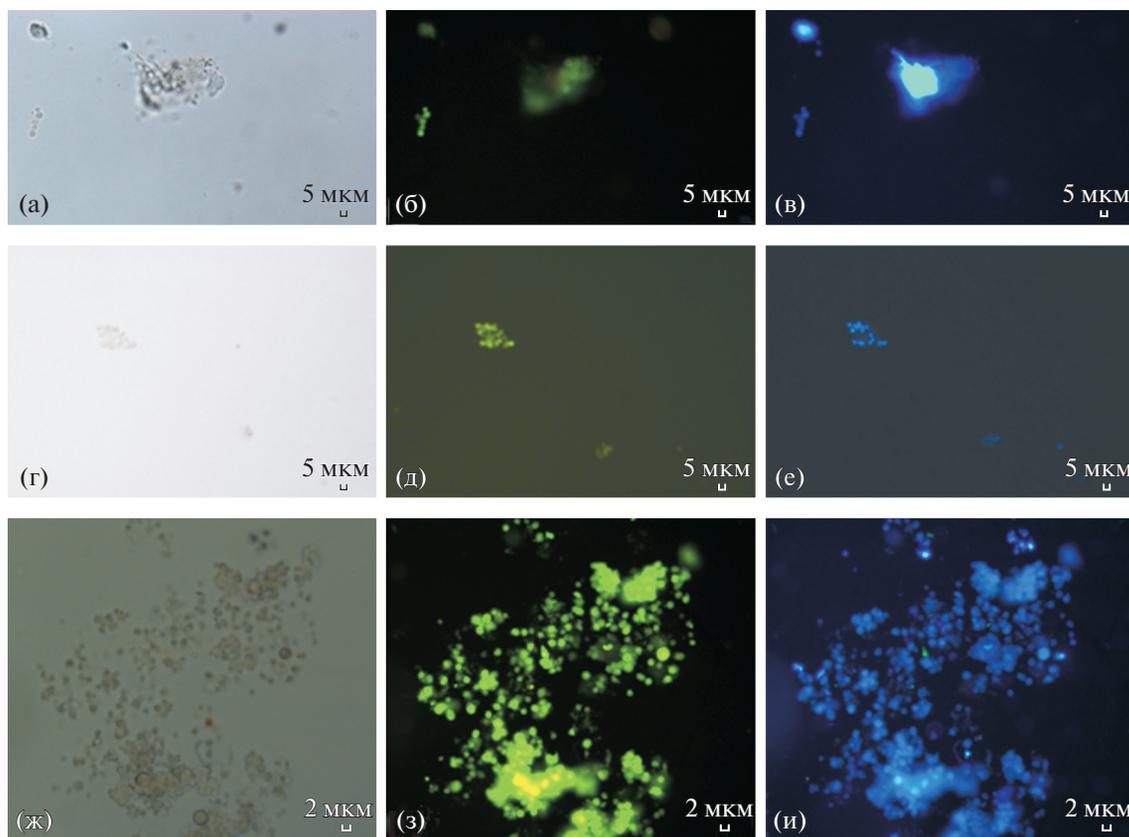
Проведенное исследование показало, что лектины, обладающие способностью специфически связываться с терминальными углеводами  $\beta$ -D-галактозой (лектин из *Arachis hypogaea*) и N-ацетил-D-галактозамином (лектин из *Glycine max*), связывались с контрольными фагоцитами Ф1 в значительно меньшей степени, чем Кон А, имеющий специфичность к  $\alpha$ -D-маннозе (рис. 2, 3).

Инкубация Ф1 с сМК приводила к подавлению связывания с поверхностными рецепторами лектина, специфичного к  $\beta$ -D-галактозе (лектин из *A. hypogaea*), на 29% (рис. 3а) и к увеличению связывания лектина из *G. max*, специфичного к N-ацетил-D-галактозамину, в 1.6 раза (рис. 3б) по сравнению с контролями ( $p < 0.001$ ). Однако сМК не влиял на связывание Кон А в Ф1 (рис. 3в). Контрольные Ф1 через 24 ч инкубации имели высокий уровень апоптоза (рис. 4). Окрашивание Hoechst 33342 показало, что доля Ф1 с признаками апоптоза составляла  $25.4 \pm 1.2\%$  (рис. 5). При этом воздействие сМК снижало уровень апоптоза в Ф1 по сравнению с таковым в контроле. Доля окрашенных Hoechst 33342 ядер Ф1 составляла  $20.5 \pm 0.9\%$  ( $p < 0.001$ ) (рис. 5).

Исследование цитокинзависимых механизмов индукции апоптоза показало, что в контрольных Ф1 через 24 ч инкубации концентрация ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ составляла  $194.8 \pm 4.7$  пг/мг белка. При добавлении сМК к Ф1 через 24 ч инкубации концентрация ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ в Ф1 снижалась в 2.8 раза по сравнению с таковой в контроле (рис. 6).

В контрольных фагоцитах Ф2 через 24 ч инкубации уровень связывания лектина из *A. hypogaea* с поверхностными рецепторами значительно превышал уровень связывания лектина с рецепторами Ф1 (рис. 7а–в; рис. 8а). Однако уровень связывания Кон А с поверхностными рецепторами Ф2 был ниже, чем с рецепторами Ф1 (рис. 7ж–7и; рис. 8в). Супернатант МК не оказывал значительного влияния на связывание лектинов из *A. hypogaea* (рис. 8а) и *G. max* (рис. 8б), однако снижал связывание Кон А, имеющего специфичность к  $\alpha$ -D-маннозе, на 34% по сравнению с контролем ( $p < 0.001$ ) (рис. 8в).

Уровень апоптоза в контрольных фагоцитах Ф2 был ниже, чем в Ф1 (рис. 9, 10). Изменение уровня связывания лектинов с Ф2 при воздействии сМК происходило на фоне стимуляции апоптоза. По данным окрашивания клеток Hoechst 33342, доля апоптотических фагоцитов Ф2 при воздействии сМК увеличилась в 2.5 раза по сравнению с контролем ( $p < 0.001$ ) (рис. 10). В контрольных Ф2 через 24 ч инкубации концентрация ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ была значительно выше, чем в Ф1 (рис. 11). При добавлении сМК к Ф2 через 24 ч инкубации концентрация



**Рис. 2.** Связывание растительных лектинов из *Arachis hypogaea* (а–в), *Glycine max* (г–е) и конканавалина А (ж–и) с поверхностными рецепторами фагоцитов Ф1 через 24 ч инкубации. а, г, ж – световая микроскопия; б, д, з – окрашивание клеток растительными лектинами, конъюгированными с FITC (зеленая флуоресценция); в, е, и – ядра клеток окрашены красителем DAPI (синяя флуоресценция).

ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ в Ф2 увеличилась в 2.1 раза по сравнению с таковой в контроле ( $p < 0.05$ ) (рис. 11).

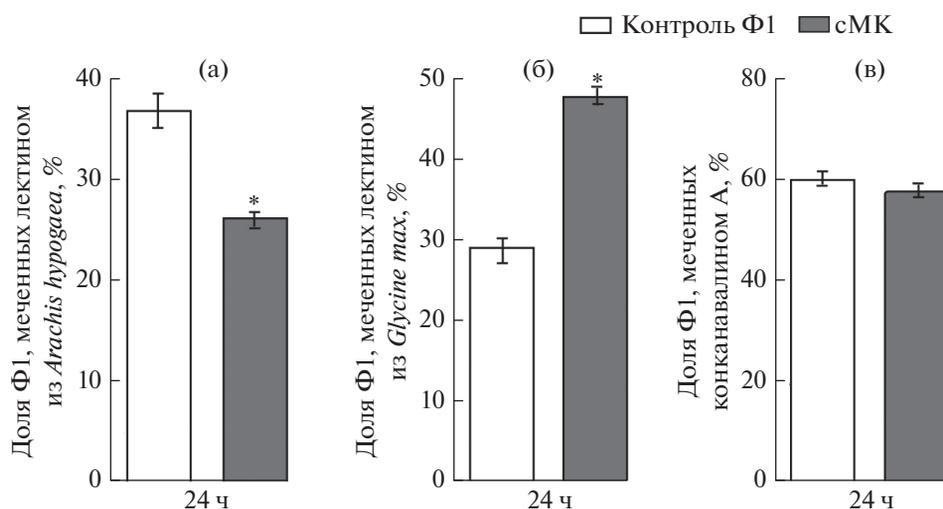
## ОБСУЖДЕНИЕ

Растительные лектины с различной углеводной специфичностью часто используются в исследованиях функциональной активности иммунных клеток как позвоночных, так и беспозвоночных животных (Сухачев и др., 2009; Павловская, Гагарина, 2017). Известно, например, что у позвоночных Кон А в основном связывается с клетками, находящимися в состоянии апоптоза (Seco-Rovira et al., 2013).

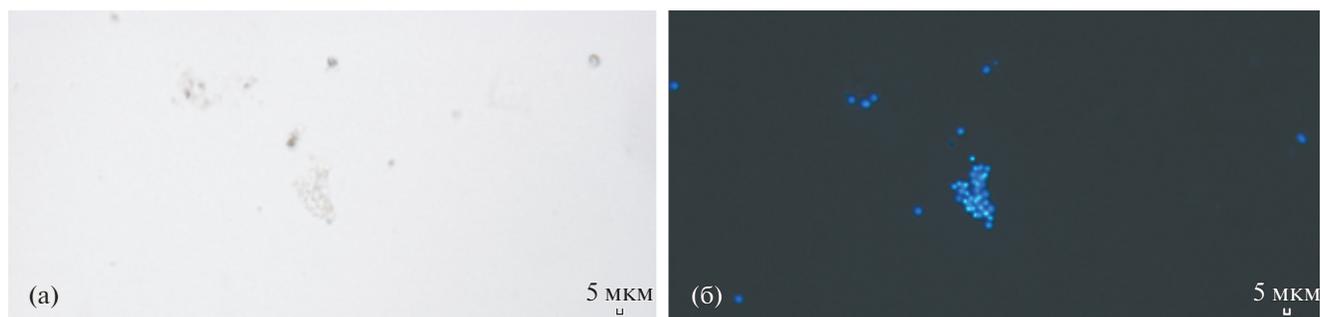
Проведенное нами исследование показало, что лектины, имеющие специфичность к  $\beta$ -D-галактозе и N-ацетил-D-галактозамину, связывались с Ф1 в значительно меньшей степени, чем лектин, имеющий специфичность к  $\alpha$ -D-маннозе. Сходные данные были получены на моллюсках *Mytilus edulis*, *Cerastoderma edule* и *Ensis siliqua* (Wootton et al., 2003; Сухачев и др., 2009). Так, Кон А взаимодействует со многими типами цело-

моцитов моллюсков, в то время как лектины арахиса связываются только с некоторыми типами клеток. При изучении углеводной специфичности гуморальных факторов гемолимфы мидии *M. edulis* было также показано, что титр гемагглютининов достоверно возрастал лишь в случае обработки клеток лектинами, специфичными к  $\alpha$ -D-маннозе (Кон А), а при взаимодействии клеток с лектинами из арахиса, специфичными к  $\beta$ -D-галактозе, увеличение было незначительным (Сухачев и др., 2009).

На втором месте после растений по содержанию лектинов находятся морские животные (угорь, моллюски, палтус, камбала) (Павловская, Гагарина, 2017). Так, из мидии *Crenomytilus grayanus* и асцидии *Lissoclinum patella* были выделены лектины, имеющие специфичность к галактозе и N-ацетил-D-галактозамину (Belogortseva et al., 1998; Molchanova et al., 2005). Принимая во внимание, что в нашем эксперименте инкубация Ф1 с сМК приводила к подавлению связывания с поверхностными рецепторами лектина из *A. hypogaea*, специфичного к  $\beta$ -D-галактозе, и к увеличению



**Рис. 3.** Связывание растительных лектинов из *Arachis hypogaea* (а), *Glycine max* (б) и конканавалина А (в) с поверхностными рецепторами фагоцитов Ф1 через 24 ч инкубации с супернатантом морулярных клеток (сМК); \* $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

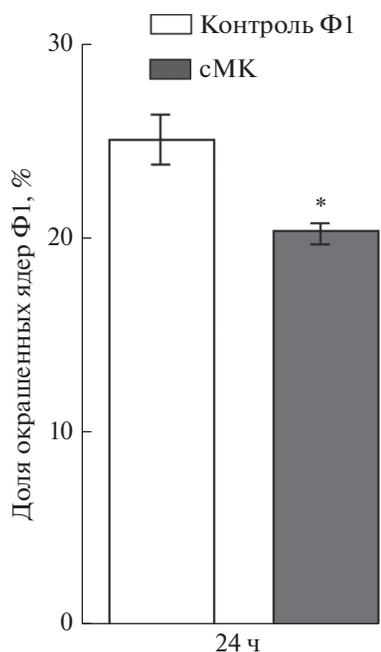


**Рис. 4.** Иммуноцитохимическое окрашивание Hoechst 33342 ядер фагоцитов Ф1 через 24 ч инкубации. а – световая микроскопия; б – ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (синяя флуоресценция).

связывания лектина из *G. max*, специфичного к N-ацетил-D-галактозамину, можно предположить, что влияние сМК на Ф1 осуществляется через рецепторы с углеводными остатками N-ацетил-D-галактозамина и  $\beta$ -D-галактозы. Кроме этого наши результаты, как и данные литературы, позволяют высказать предположение о том, что и у голотурии *E. fraudatrix* имеются лектины со специфичностью к N-ацетил-D-галактозамину и  $\beta$ -D-галактозе.

Полученные данные по антиапоптотическому воздействию сМК на Ф1 показывают, что влияние на апоптоз, по-видимому, осуществляется лектинами со специфичностью к N-ацетил-D-галактозамину подобно лектину из *G. max*, а также к  $\beta$ -D-галактозе подобно лектину из *A. hypogaea*. Отсутствие изменений в связывании Кон А фагоцитами первого типа при воздействии морулярных клеток, вероятно, определяется высоким уровнем апоптоза в контрольных Ф1 и максимальной экспрессией рецепторов.

Исследование цитокинзависимых механизмов модуляции апоптоза показало, что снижение апоптоза в Ф1 при воздействии сМК сопровождалось ингибированием в фагоцитах уровня проапоптотических продуктов (ингибирование концентрации ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ). Известно, что у позвоночных животных при увеличении концентрации ИЛ-1 $\alpha$  повышается уровень апоптоза (Чечина и др., 2009). Многие лектины при иммунном ответе вызывают повышение синтеза провоспалительных цитокинов, что может быть связано с изменением их внутриклеточного синтеза или с ускоренным высвобождением. Однако лишь некоторые лектины способны снижать сверхэкспрессию цитокинов (Черников и др., 2007). К таким лектинам относится GalNAc/Gal – специфичный лектин из мидии *S. grayanus*. Можно предположить, что и в данной работе снижение уровня ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ в Ф1 при воздействии сМК связано с лектинами, специфичными к N-ацетил-D-галактозамину по-

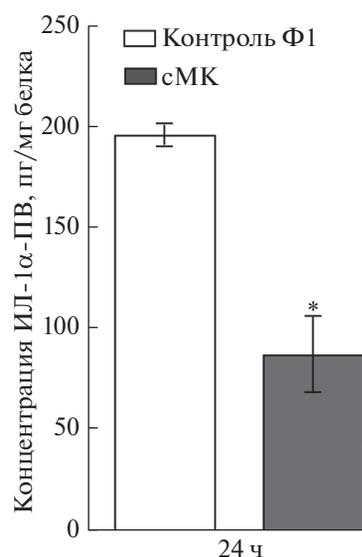


**Рис. 5.** Доля окрашенных Hoechst 33342 ядер фагоцитов Φ1 через 24 ч инкубации с супернатантом модулярных клеток (сМК); \* $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

добно лектину из *G. tax* и  $\beta$ -D-галактозе подобно лектину из *A. hypogaea*. Модулярные клетки являются основным продуцентом ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ среди целомочитов асцидий (Ballarin et al., 2001). Сопоставление снижения концентрации ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ в Φ1 через 24 ч инкубации с сМК с изменением уровня апоптоза (рис. 5) указывает на то, что ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ голотурий, по-видимому, являются антиапоптотическими медиаторами при взаимодействии МК и Φ1, как и ИЛ-1 $\alpha$  позвоночных (McAllister et al., 2012).

Показано, что снижение связывания Кон А с поверхностными рецепторами Φ2 при воздействии сМК, по-видимому, происходит за счет присутствия эндогенных маннан-связывающих лектинов из МК, которые блокируют связывание FITC-меченного Кон А с Φ2. Известно, что в целомической жидкости иглокожих содержатся маннан-связывающие лектины. Они взаимодействуют с маннанами — углеводными структурами, представляющими собой разветвленные олиго- и полисахариды, построенные из остатков маннозы. Эти лектины синтезируются морулоподобными клетками голотурий (Петрова и др., 2009).

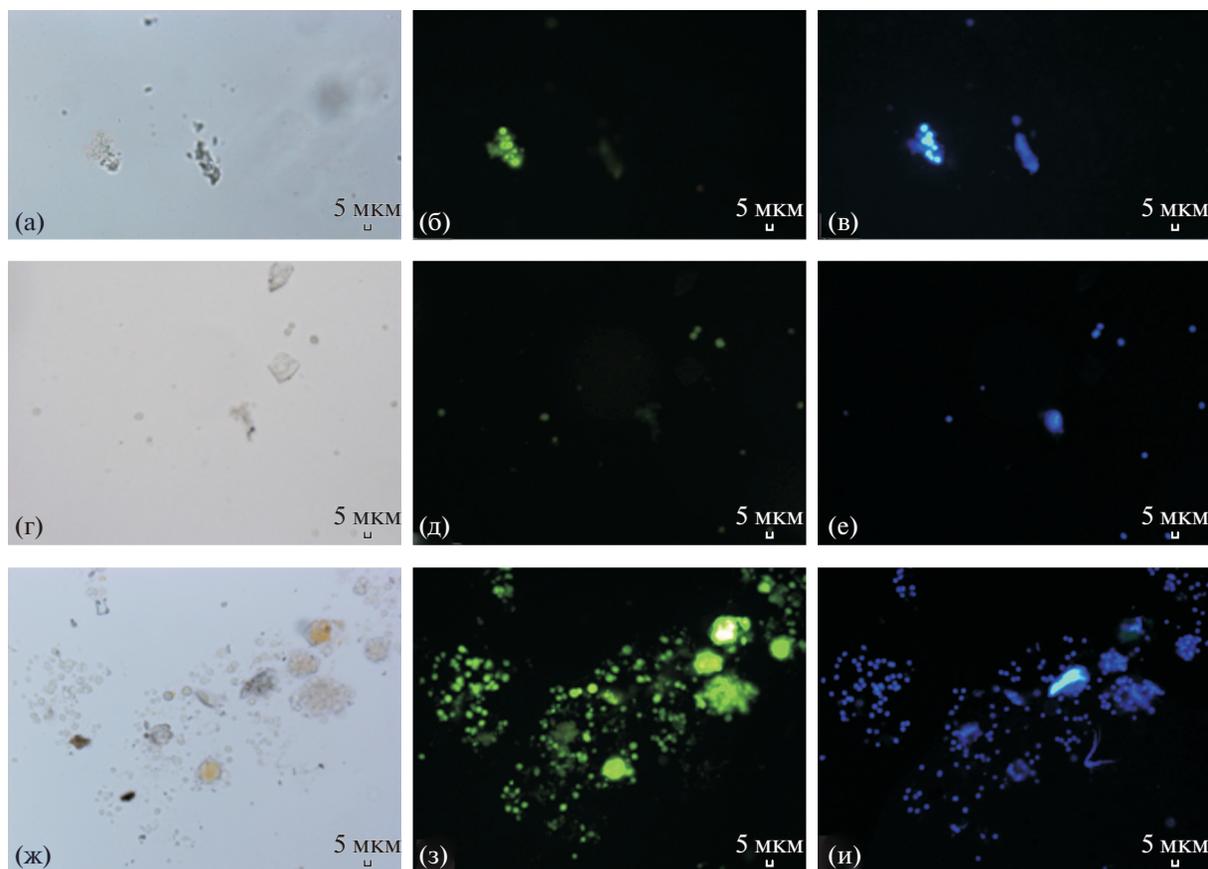
Изменения в уровне связывания лектинов с Φ2 при воздействии сМК, происходящие на фоне стимуляции апоптоза, указывают на то, что гуморальная регуляция Φ2 модулярными клетками осуществляется при участии лектинов, имеющих



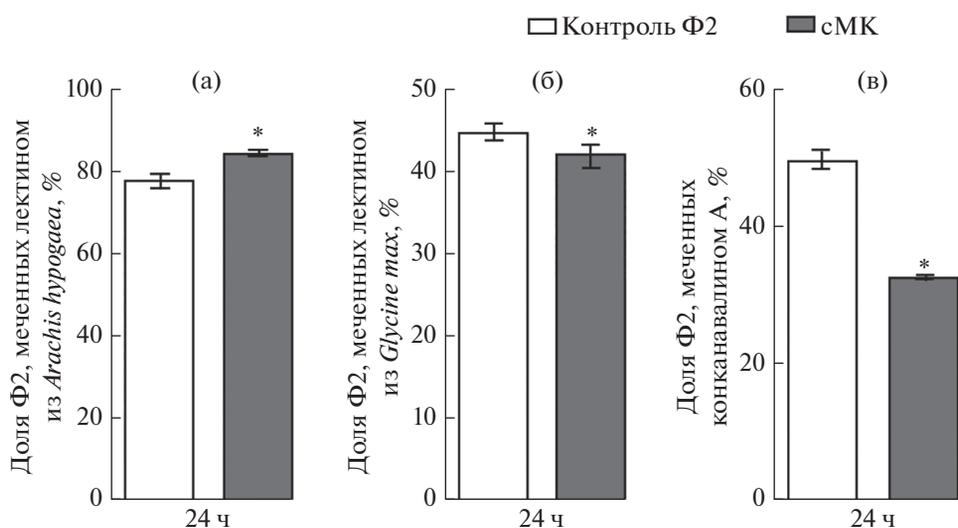
**Рис. 6.** Концентрация интерлейкин-1 $\alpha$ -подобных веществ (ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ) в фагоцитах Φ1 через 24 ч инкубации с супернатантом модулярных клеток (сМК); \* $p < 0.001$  по сравнению с контролем.

специфичность к  $\alpha$ -D-маннозе. Опубликованные данные также свидетельствуют о ведущей роли лектинов, в частности имеющих специфичность к  $\alpha$ -D-маннозе, в стимуляции апоптоза иммунных клеток голотурии *E. fraudatrix* (Долматова и др., 2006), позвоночных животных (Долматова и др., 2010; Seco-Rovira et al., 2013), а также опухолевых клеток (Liu et al., 2009). Исследование уровня цитокиноподобных веществ в фагоцитах показало, что концентрация ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ в фагоцитах Φ2 была значительно выше, чем в Φ1. Различие в уровне ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ у фагоцитов двух типов позволяет говорить о функциональных различиях Φ1 и Φ2 и свидетельствует о разной роли данных фагоцитов в иммунном ответе. Увеличение концентрации ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ в Φ2 при воздействии сМК указывает на то, что стимуляция апоптоза в Φ2 лектинами, имеющими специфичность к  $\alpha$ -D-маннозе, происходила благодаря влиянию на продукцию ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ.

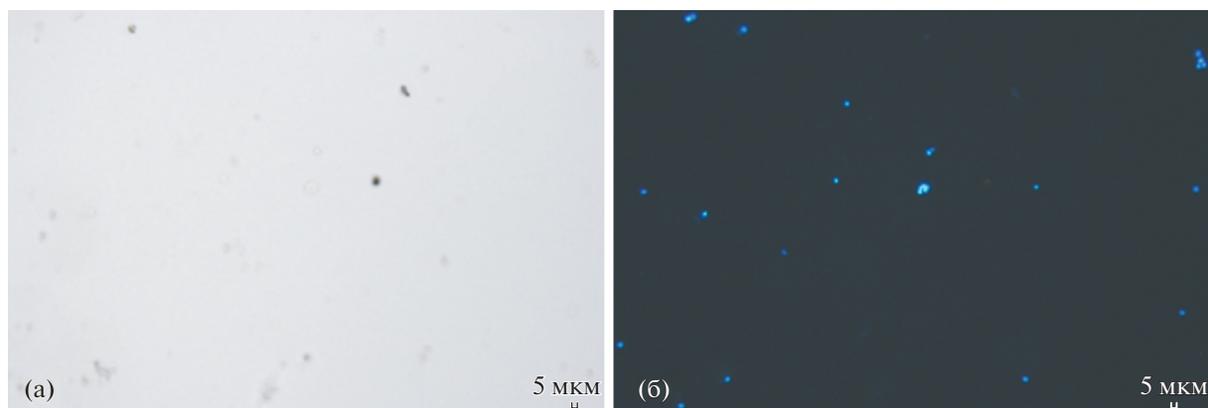
Известно, что макрофаги позвоночных обладают высокой пластичностью. Следствие этого — присутствие не только агрессивных клеток (M1), вступающих на защиту организма-хозяина, но и клеток с полярной функцией (M2), отвечающих за процессы восстановления поврежденных тканей (Sharougi-Moghaddam et al., 2018). Полученные нами данные о противоположном влиянии МК на уровень апоптоза, концентрацию цитокиноподобных веществ и экспрессию поверхностных рецепторов к лектинам в фагоцитах двух типов указывают на функциональные различия Φ1 и Φ2, что предполагает эволюционную древность



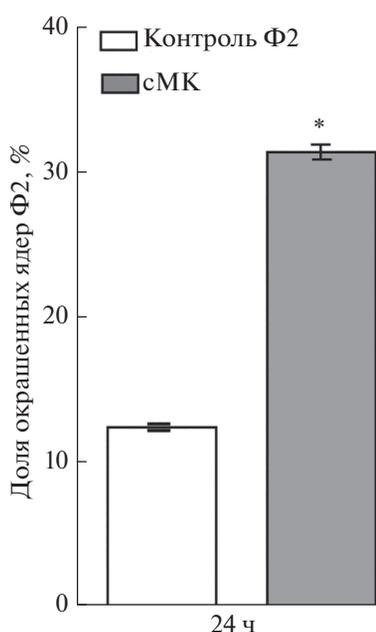
**Рис. 7.** Связывание растительных лектинов из *Arachis hypogaea* (а–в), *Glycine max* (г–е) и конканавалина А (ж–и) с поверхностными рецепторами фагоцитов Ф2 через 24 ч инкубации. а, г, ж – световая микроскопия; б, д, з – окрашивание клеток растительными лектинами, конъюгированными с FITC (зеленая флуоресценция); в, е, и – ядра клеток окрашены красителем DAPI (синяя флуоресценция).



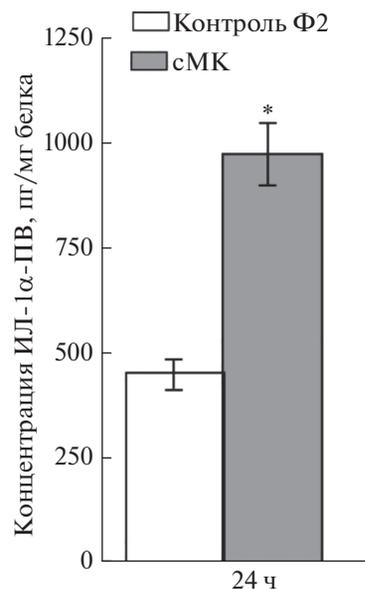
**Рис. 8.** Связывание растительных лектинов из *Arachis hypogaea* (а), *Glycine max* (б) и конканавалина А (в) с поверхностными рецепторами фагоцитов Ф2 через 24 ч инкубации с супернатантом морулярных клеток (сМК); \* $p < 0.001$  по сравнению с контролем.



**Рис. 9.** Иммуноцитохимическое окрашивание Hoechst 33342 ядер фагоцитов Ф2 через 24 ч инкубации. а – световая микроскопия; б – ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (синяя флуоресценция).



**Рис. 10.** Доля окрашенных Hoechst 33342 ядер фагоцитов Ф2 через 24 ч инкубации с супернатантом морулярных клеток (сМК); \* $p < 0.001$  по сравнению с контролем.



**Рис. 11.** Концентрация интерлейкин-1 $\alpha$ -подобных веществ (ИЛ-1 $\alpha$ -ПВ) в фагоцитах Ф2 через 24 ч инкубации с супернатантом морулярных клеток (сМК); \* $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

феномена дифференцированного иммунного ответа макрофагов.

Таким образом, показано, что секреторные продукты морулоподобных клеток влияют на уровень апоптоза, концентрацию цитокиноподобных веществ и экспрессию поверхностных рецепторов в двух типах фагоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* противоположным образом. При этом изменение уровня апоптоза в Ф1 и Ф2 (снижение в Ф1 и увеличение в Ф2) зависит от экспрессии разных рецепторов. В Ф1 задействованы рецепторы с углеводными остатками N-аце-

тил-D-галактозамина (подобно лектину из сои *G. max*) и  $\beta$ -D-галактозы (подобно лектину из арахиса *A. hypogaea*), а в Ф2 –  $\alpha$ -D-маннозы (подобно коммерческому маннозоспецифичному лектину Кон А). Полученные данные свидетельствуют в пользу представлений о разной роли Ф1 и Ф2 в иммунном ответе. Кроме этого различие в уровне связывания лектинов с поверхностными рецепторами Ф1 и Ф2 указывает на различие в их рецепторном аппарате и на возможность использования определения связывания лектинов с клетками для фенотипирования данных иммунцитов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беседнова Н.Н.* Морские гидробионты – потенциальные источники лекарств // *Здоровье. Мед. экология. Наука.* 2014. № 3 (57). С. 4–10.
- Долматова Л.С., Елисейкина М.Г., Ромашина В.В.* Антиоксидантная ферментативная активность целоцитов дальневосточной голотурии *Eupentacta fraudatrix* // *Журн. эволюц. биохим. и физиол.* 2004. Т. 40. № 2. С. 104–111.
- Долматова Л.С., Заика О.А., Недашковская Е.П. и др.* Исследование механизмов апоптоз модулирующего влияния термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* и корригирующего действия экстракта из дальневосточных видов голотурий на нейтрофилы крыс *in vitro* // *Тихоокеан. мед. журн.* 2010. № 3. С. 76–80.
- Долматова Л.С., Шиткова О.А., Долматов И.Ю. и др.* Термостабильный летальный токсин *Yersinia pseudotuberculosis* индуцирует апоптоз и ингибирует экспрессию поверхностных рецепторов к лектинам в иммуноцитах голотурии *Eupentacta fraudatrix* // *Журн. микробиологии.* 2006. № 3. Приложение. С. 23–28.
- Долматова Л.С., Уланова О.А.* Изменения антиоксидантной ферментативной активности фагоцитов и морулярных клеток голотурии *Eupentacta fraudatrix* при взаимодействии клеток и их модуляция дексаметазоном // *Фундам. исследования.* 2014. № 5(2). С. 276–282.
- 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. Мед. экология. Наука.* 2017. Т. 70. № 3. С. 108–111.
- Запорожец Т.С., Иванушко Л.А., Звягинцева Т.Н. и др.* Цитокининдуцирующая активность биополимеров морских гидробионтов // *Мед. иммунология.* 2004. Т. 6. № 1/2. С. 89–96.
- Кудрявцев И.В., Дьячков И.С., Казаков А.А. и др.* Клеточные реакции врожденного иммунитета морской звезды *Asterias rubens* // *Журн. эволюц. биохим. и физиол.* 2005. Т. 41. № 2. С. 107–113.
- Одинцова Н.А.* Основы культивирования клеток морских беспозвоночных. Владивосток: Дальнаука. 2001. 162 с.
- Павловская Н.Е., Гагарина И.Н.* Функциональная роль лектинов растений как предпосылка для их применения в биотехнологии // *Химия раст. сырья.* 2017. № 1. С. 21–35.
- Петрова И.Ю., Булгаков А.А., Назаренко Е.Л. и др.* Маннан-связывающие лектины в целомической жидкости у представителей разных видов дальневосточных иглокожих // *Биол. моря.* 2009. Т. 35. № 2. С. 147–152.
- Рапопорт Е.М., Почечуева Т.В., Курмышкина О.В. и др.* Твердофазные системы для исследования углеводной специфичности галектинов // *Биохимия.* 2010. Т. 75. № 3. С. 380–390.
- Сухачев А.Н., Кудрявцев И.В., Николаев К.Е. и др.* Влияние лектинов различной углеводной специфичности на гемолитическую активность гемоцитов мидии *Mytilus edulis* // *Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера: Материалы XXVIII Международ. конф. 5–8 октября 2009 г.* Петрозаводск: КарНЦ РАН. 2009. С. 538–542.
- Черников О.В., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Лукьянов П.А.* Биологическая активность лектинов морских гидробионтов // *Вестн. ДВО РАН.* 2007. № 6. С. 131–135.
- Чечина О.Е., Биктасова А.К., Сазонова Е.В. и др.* Роль цитокинов в редокс-зависимой регуляции апоптоза // *Бюл. сиб. медицины.* 2009. № 2. С. 67–72.
- Ballarin L., Franchini A., Ottaviani E., Sabbadin A.* Morula cells as the major immunomodulatory hemocytes in ascidians: evidences from the colonial species *Botryllus schlosseri* // *Biol. Bull.* 2001. V. 201. P. 59–64.
- Belogortseva N.I., Molchanova V.I., Kurika A.V. et al.* Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* // *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 1998. V. 119. № 1. P. 45–50.
- Bradford M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
- Chia F., Xing J.* Echinoderm coelomocytes // *Zool. Stud.* 1996. V. 35. № 4. P. 231–254.
- Liu B., Min M.W., Bao J.K.* Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanism in cancer cells // *Autophagy.* 2009. V. 5. P. 432–433.
- McAllister C.S., Lakhdari O., Pineton de Chambrun G. et al.* TLR3, TRIF, and caspase 8 determine double-stranded RNA-induced epithelial cell death and survival *in vivo* // *J. Immunol.* 2012. V. 190. P. 418–427.
- McKenzie A.N., Preston T.M.* Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by lectin staining and density centrifugation // *Dev. Comp. Immunol.* 1992. V. 16. P. 19–30.
- Molchanova V., Chikalovets I., Li W. et al.* New GlcNAc/GalNAc-specific lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1723. P. 82–90.
- Pollack A., Ciancio G.* Cell cycle phase-specific analysis of cell viability using Hoechst 33342 and propidium iodide after ethanol preservation // *Methods Cell Biol.* 1990. V. 33. P. 19–24.
- Seco-Rovira V., Beltrán-Frutos E., Ferrer C. et al.* Lectin histochemistry as a tool to identify apoptotic cells in the seminiferous epithelium of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) subjected to short photoperiod // *Reprod. Domest. Anim.* 2013. V. 48. № 6. P. 974–983.

- Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H. et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease // *J. Cell Physiol.* 2018. V. 233. P. 6425–6440.
- Wootton E.C., Dyrinda E.A., Ratcliffe N.A.* Bivalve immunity: comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) // *Fish Shellfish Immunol.* 2003. V. 15. P. 195–210.
- Zaika O.A., Dolmatova L.S.* Cooperative apoptosis of coelomocytes of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* and its modulation by dexamethasone // *Adv. Biosci. Biotechnol.* 2013. V. 4. P. 908–917.

## **Influence of Secretory Products of Morula Cells on Phagocytes of the Holothurian *Eupentacta fraudatrix* (Djakonov et Baranova, 1958) (Sclerodactylidae: Dendrochirotida)**

**O. A. Ulanova<sup>a</sup> and L. S. Dolmatova<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Ilichev Pacific Oceanological Institute, Far Eastern Branch,  
Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690041, Russia*

Influence of humoral products of morula cells (MC) on apoptosis, on concentration of cytokinin-like compounds, and expression of cell-surface receptors specific to plant lectins from *Arachis hypogaea*, *Glycine max* and to concanavalin A (Con A) was studied in two types of phagocytes (P1 and P2) of the Far Eastern sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. Our data show that MC supernatant reduced the level of apoptosis and concentration of interleukin-1 $\alpha$ -like factors (IL-1 $\alpha$ -LF) in P1, but increased them in P2. We suppose that an increase in IL-1 $\alpha$ -LF concentration stimulates apoptosis in P2 of *E. fraudatrix* under the effect of MC supernatant treatment. Moreover, opposite changes in the apoptosis levels in the two types of phagocytes in response to MC supernatant influence correlate with expression of different receptors: the carbohydrate residues N-acetyl-D-galactosamine- and  $\beta$ -D-galactose-containing receptors are engaged in P1, and  $\alpha$ -D-mannose-containing receptors – in P2. Taken together, our results support the idea of differential roles of phagocytes P1 and P2 in the holothurian immune response. The study suggests, that the differences in binding capacity of lectins to P1 and P2 cell-surface receptors indicate differences in their receptor apparatus and the possibility of using the binding capacities of lectins to phagocytes for phenotyping of these immunocytes.

*Keywords:* cell interaction, phagocytes, morula cells, holothurian immunity, apoptosis, lectins