

ВЛИЯНИЕ ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ТОКСИНА БАКТЕРИИ *Yersinia pseudotuberculosis* НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДВУХ ТИПОВ ФАГОЦИТОВ ГОЛОТУРИИ *Eupentacta fraudatrix*

© 2021 г. Л. С. Долматова*,[@], О. А. Уланова*, Н. Ф. Тимченко**

*Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева, ул. Балтийская, 43, Владивосток, 690041 Россия

**Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, ул. Сельская, 1, Владивосток, 690087 Россия

[@]E-mail: dolmatova@poi.dvo.ru

Поступила в редакцию 06.11.2020 г.

После доработки 13.11.2020 г.

Принята к публикации 16.12.2020 г.

Исследовано влияние термостабильного токсина *Yersinia pseudotuberculosis* (ТсТүр) на показатели функциональной активности и фенотип Ф1 и Ф2 фагоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix*. Установлено, что Ф1 и Ф2 фагоциты отличались по уровню апоптоза и содержанию восстановленного глутатиона, а также по экспрессии поверхностных рецепторов к некоторым растительным лектинам. ТсТүр (0.2–2 мкг/мл) сдвигал показатели функциональной активности и фенотип Ф1 фагоцитов в сторону преобладания таковых, характерных для Ф2 типа, обладающего меньшей бактерицидной активностью. Предполагается, что ТсТүр является важным фактором перепрограммирования фагоцитов голотурий в сторону преобладания антивоспалительного типа, что может увеличивать вирулентность *Y. pseudotuberculosis* для голотурий.

DOI: 10.31857/S1026347021040056

Иммунная система живых организмов эволюционировала, прежде всего, в связи с необходимостью защиты от инфекций (Danilova, 2006). У беспозвоночных преобладает неспецифический врожденный иммунитет, хотя могут проявляться некоторые элементы иммунной памяти (Netea *et al.*, 2011). При этом иммунитет беспозвоночных демонстрирует высокие защитные способности. Вместе с тем, эволюционирует не только иммунная система, но и инфекционные агенты, в частности, бактерии, которые адаптируются к иммунитету организма хозяина (Danilova, 2006).

Иглокожие (Echinodermata), являющиеся морскими обитателями, широко распространенными в мировом океане (Dolmatova, Dolmatov, 2020), привлекают внимание иммунологов в связи с их эволюционной близостью к позвоночным. При этом многие представители класса голотурий (Holothuroidea) являются ценными коммерческими объектами и выращиваются в мариккультуре (Долматова и др., 2019), в связи с чем изучение их иммунитета представляет не только теоретический, но и практический интерес.

В частности, потенциально опасным для голотурий является заражение *Yersinia pseudotuberculosis*. Возбудитель псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis*

является кишечной бактерией, заражение которой осуществляется через пищу и воду (Vi *et al.*, 2012). Как и многие другие бактерии, иерсинии имеют различные факторы, позволяющие им выживать как в окружающей среде, так и организме хозяина (Ценева и др., 2002). Макрофаги являются главной целью иерсиний *in vivo*, и *Y. pseudotuberculosis* может выживать и размножаться внутри макрофагов. К способствующим этому факторам относят несколько известных эффекторных белков Yops (Vi *et al.*, 2012). Меньше известна роль токсинов бактерии. При этом фактор патогенности термостабильный летальный токсин *Y. pseudotuberculosis* (ТсТүр), белок с мол. массой 45 кДа, подавляет фагоцитоз и снижает уровень активных форм кислорода (АФК) в макрофагах перитонеального экссудата мышей, что свидетельствует об его участии в подавлении иммунитета хозяина. ТсТүр продуцируется не только при высокой (37°C), но и при низкой (6–8°C) температуре, что позволяет предполагать его важную роль при выживании бактерии в окружающей среде. Известно, что *Y. pseudotuberculosis* может долго выживать в морской воде, вызывая гибель морских беспозвоночных, в частности, голотурий (Тимченко и др., 2004). При этом морские гидробионты не только

сами страдают от инфекции, но и являются факторами передачи ее возбудителя. Поэтому необходимо разработать методы защиты животных от потенциальных инфекций. Однако особенности клеточного иммунного ответа голотурий на воздействие факторов патогенности иерсиний остаются мало изученными.

Одним из перспективных для выращивания в аквакультуре видов является голотурия *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov et Baranova, 1958) (Dendrochirotida, Sclerodactylidae). Ранее с использованием градиентного центрифугирования фагоциты голотурии, являющиеся аналогами макрофагов (Chia, Xing, 1996), были разделены на две фракции, Ф1 и Ф2 фагоциты. Было показано, что при воздействии ТсТур в фагоцитах голотурии *E. fraudatrix* происходит снижение уровня АФК (Dolmatova et al., 2003). ТсТур также вызывает сдвиг в соотношении маркеров двух типов фагоцитов голотурии – оксида азота, высокая концентрация которого характеризует Ф1 тип фагоцитов, и активности аргиназы, высокое значение которой характерно для Ф2 типа (Долматова и др., 2019).

Известно, что у позвоночных макрофаги могут приобретать провоспалительный (М1 макрофаги, “классически” активированные) или противовоспалительный (М2 макрофаги, “альтернативно” активированные) фенотипы в ответ на различные сигналы микроокружения. Макрофаги М1 играют ключевую роль в защите от бактериальных инфекций, а М2 макрофаги вовлечены в восстановление тканей. Два типа макрофагов имеют разные метаболические пути для генерации энергии, гликолиз преобладает в М1 типе, а окислительный метаболизм в – М2 типе клеток (Dolmatova, Dolmatov, 2020), и в их регуляции большое значение имеет восстановленный глутатион (GSH) (Peterson et al., 1998).

Сдвиг в соотношении активностей двух типов макрофагов в сторону преобладания активности М2 типа представляет собой стратегию подавления иммунитета хозяина, с участием некоторых бактериальных белковых токсинов, у ряда бактерий (Tsai et al., 2013; Merriman et al., 2015), в том числе, иерсиний (Vi et al., 2012).

Выявление сдвига в уровне маркеров двух типов фагоцитов голотурии при воздействии ТсТур (Долматова и др., 2019), позволило предположить, что, как и макрофаги позвоночных, два типа фагоцитов играют различную роль в антибактериальной защите.

Цель данного исследования - выявление особенностей влияния ТсТур на некоторые функциональные, метаболические и фенотипические показатели двух типов фагоцитов голотурии *E. fraudatrix*.

Работа написана по материалам доклада, представленного на 10-ой Европейской конференции

по иглокожим, которая проходила 16–19 сентября 2019 г. в Москве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экземпляры голотурии *E. fraudatrix* с длиной тела от 4 до 6 см были собраны в зимний период в бухте Восток (залив Петра Великого Японского моря) с использованием легководолазного снаряжения. Голотурий выдерживали в аквариуме с проточной аэрируемой морской водой в течение двух недель до начала экспериментов.

Для исследований *in vitro* (четыре независимых опыта) объединяли образцы целомической жидкости от 15–20 особей, после чего наслаивали на двухступенчатый градиент, ступени которого состояли из фиколл-верографина (1.078), разведенного антикоагулирующим раствором в два или три раза (v/v), как описано ранее (Долматова, Заика, 2007). Полученные после центрифугирования при 300 g в течение 15 мин суспензии фагоцитов с меньшей (Ф1 фагоциты) и большей (Ф2 фагоциты) плотностью отмывали дважды в фосфатно-солевом буфере (рН 7.6) с добавлением 36 г/л NaCl (ФСБН) и ресуспендировали в модифицированной среде 199 как описано ранее (Dolmatova et al., 2003). Концентрацию клеток определяли в камере Горяева; жизнеспособность – методом исключения трипанового синего.

ТсТур изолировали из штамма 512 I серовара *Y. pseudotuberculosis* (коллекция НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова). Выделение и очистку ТсТур проводили методами, описанными ранее (Тимченко и др., 2004).

Для исследования эффектов ТсТур в каждую лунку круглодонного планшета вносили по 1 мл суспензии фагоцитов с концентрацией 1×10^6 кл/мл. Инкубацию клеток проводили при комнатной температуре в течение 1 или 24 ч. ТсТур использовали в конечных концентрациях 0,2, 0,5 и 2 мкг/мл. В отдельной серии экспериментов исследовали влияние ТсТур (0,15 мкг/мл) на концентрацию GSH через 24 ч инкубации. В контрольные лунки вместо исследуемых препаратов вносили ФСБН.

По окончании экспериментов в части полученных суспензий клеток определяли жизнеспособность, еще одну часть суспензии замораживали при -80°C для последующего определения концентрации GSH. Из порции клеток выделяли ДНК с использованием 4М гуанидин гидрохлорида в качестве депротенинирующего агента (Sigma-Aldrich, США) (Pramanick et al., 1976).

Для последующего определения конденсации хроматина еще одну порцию осадка клеток ($0,3\text{--}0,5 \times 10^6$ кл/мл) фиксировали 4%-ным формалином и хранили при 4°C .

Кроме того, часть клеток для последующего анализа связывания растительных лектинов фикс-

сировали 1%-ным глутаральдегидом в ФСБН и хранили при 4°C.

Для исследования апоптоза использовали такие маркеры, как фрагментация ДНК и конденсация хроматина. Фрагментацию ДНК изучали методом горизонтального электрофореза ДНК в 1%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере (pH 8.3) с последующим окрашиванием геля бромистым этидием. В качестве маркера мол. массы использовали синтетический ДНК-маркер ("Сиб-энзим", Россия). Для учета апоптоза по конденсации хроматина проводили окрашивание отмытых от формалина клеток Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) (1 мкг/мл в ФСБН) как описано Комацу с соавт. (Komatsu *et al.*, 1998). Образцы анализировали, используя микроскоп Leica DM 4500 (Wetzlar, Германия). В каждой повторности исследовали не менее 100 клеток.

Для определения экспрессии поверхностных рецепторов фагоцитов использовали окрашивание отмытых от глутаральдегида клеток ФИТЦ-конъюгированными растительными лектинами (ICN Biomedicals, Германия) из *Arachis hypogaea* (PNA), *Glycin max* (SBA), *Dolichos biflorus* (DBA) и *Canavalia ensiformis* (con A), которые специфично связываются с Gal β 1–3GalNAc, GalNAc α 1–3GalR, GalNAc и α -D-маннопиранозидами соответственно (Гнедкова и др., 2015). Окрашивание проводили по методу, описанному Мак Кензи, Престон (McKenzie, Preston, 1992). Флуоресценцию конъюгатов изучали с использованием микроскопа Leica DM 4500 (Wetzlar, Германия). Уровень связывания лектинов с поверхностными рецепторами фагоцитов оценивали по процентному содержанию клеток с зонами яркой зеленой флуоресценции. Ядра клеток визуализировали с помощью окраски DAPI (Merck, Германия). В каждой повторности исследовали не менее 100 клеток.

Анализ содержания восстановленного глутатиона проводили с использованием в качестве деприватизационного реагента реактива Элмана (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота) (ДТНБ) по модифицированному методу Фратернале с соавт. (Fraternale *et al.*, 2013). Клетки лизировали в 120 мкл лизирующего буфера (0.1%-ный тритон X-100, 0.1 М Na₂HPO₄, 5 мМ EDTA, pH 7.5), добавляли 16 мкл 0.1 н HCl и половинный объем осаждающего раствора (1.67 г ледяной ортофосфорной кислоты, 0.2 г Na₂EDTA, 30 г NaCl в 100 мл раствора). После центрифугирования (10000 × g, 10 мин) отбирали супернатант, разносили его в лунки 96-луночного планшета (две опытных и две контрольных параллели на каждую пробу). В каждую лунку вносили 25% (v/v) 0.3 М фосфорной кислоты и 10% по объему 1%-ного цитрата натрия (контроль) или ДТНБ (1 мМ) в 1%-ном растворе цитрата натрия (опыт). Через 5 мин измеряли оптическую плотность растворов на

планшетном спектрофотометре STAT Fax 2100 (Awarner Technology Inc., США) при 402 нм. Концентрацию GSH в пробе определяли по калибровочной кривой со стандартом GSH (Sigma-Aldrich, США), построенной в диапазоне концентраций 12.5–100 мкМ.

Концентрацию белка в пробах измеряли с использованием красителя Кумасси G-250 (Sigma-Aldrich).

Работа частично выполнена с использованием оборудования Дальневосточного центра электронной микроскопии ННЦ морской биологии ДВО РАН.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad InStat, v. 3.01 (GraphPad Software, Inc.). Полученные данные представлены как средние значения \pm средняя ошибка измерений. Достоверность различий определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента. Разницу между группами считали достоверной при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Апоптоз фагоцитов голотурии *E. fraudatrix* в норме и при действии ТсТҮр. Апоптоз макрофагов является одним из видов их смерти, ассоциированной с осуществлением микробицидной активности (Molloy *et al.*, 1994).

С помощью электрофореза ДНК в агарозном геле выявлено, что в свежeweделенных клетках фрагментация ДНК значительно более выражена в фагоцитах второго типа по сравнению с таковой в первом типе. Такое же соотношение в уровнях фрагментации ДНК сохранялось в фагоцитах и через 24 ч инкубации (рис. 1а). Оценка апоптоза по конденсации хроматина показала, что в количественном отношении уровень последней в свежeweделенных Ф2 фагоцитах превышал таковую в Ф1 клетках в 1.9 раза (рис. 1б, 1в).

Через 1 ч инкубации конденсация хроматина в Ф2 фагоцитах была выше таковой в фагоцитах Ф1 в 1.8 раза (рис. 1г, 1е). При этом добавление в среду инкубации ТсТҮр через 1 ч вызывало статистически значимое изменение (снижение) апоптоза в Ф1 фагоцитах только в максимальной концентрации 2 мкг/мл, а в Ф2 фагоцитах, напротив, стимулировало апоптоз, но только в концентрации 0.5 мкг/мл.

Через 24 ч также сохранялось значительное превышение (в 2.1 раза) конденсации хроматина в Ф2 по сравнению с Ф1 клетками (рис. 1д, 1ж). При воздействии ТсТҮр апоптоз в Ф1 снижался уже в концентрациях 0.2–0.5 мкг/мл, а при концентрации 2 мкг/мл возвращался к контрольному уровню. В Ф2 фагоцитах токсин в этот период проявил лишь тенденцию к стимулированию апоптоза во всех исследованных концентрациях.

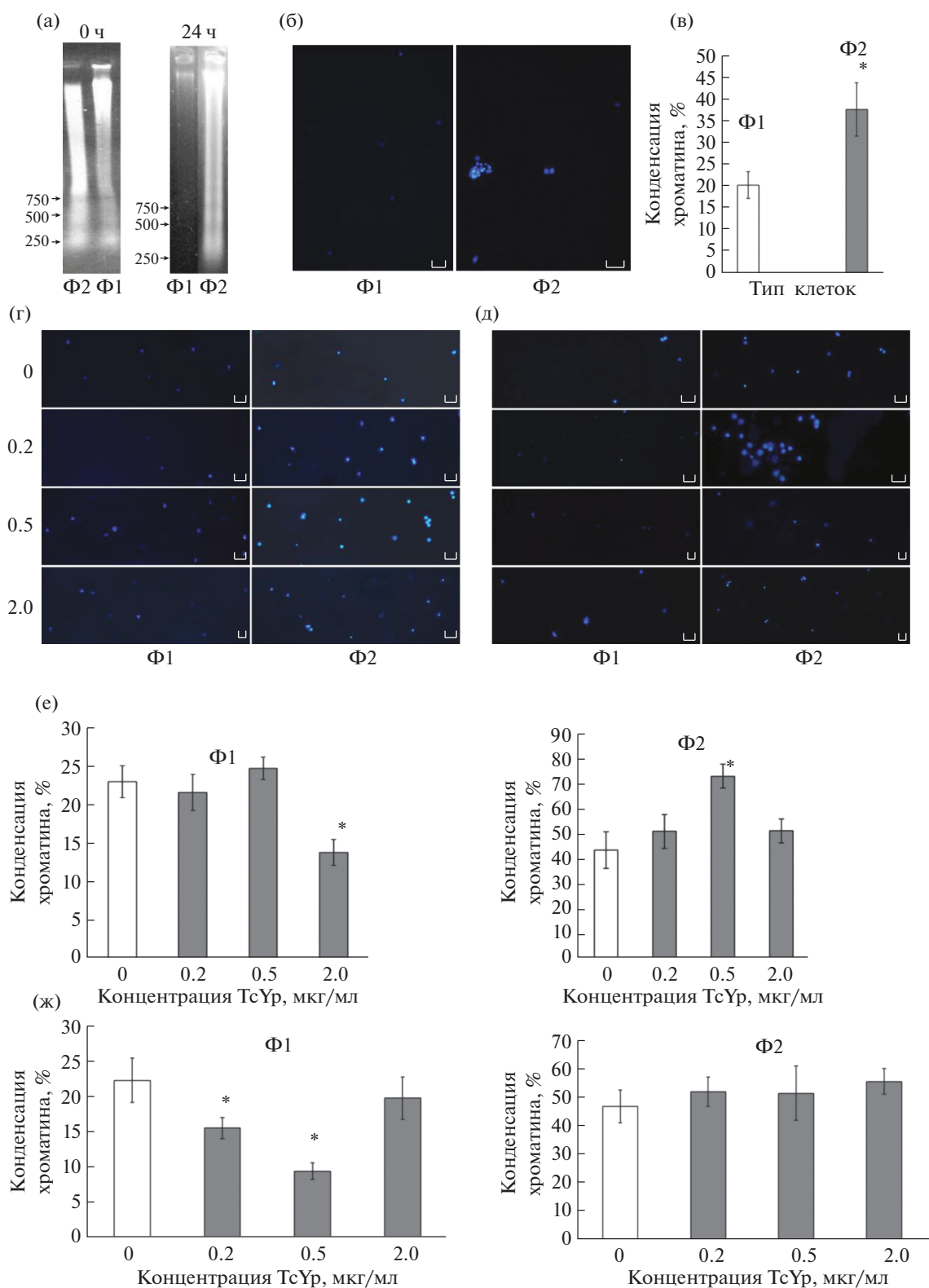


Рис. 1. Маркеры апоптоза в Ф1 и Ф2 фагоцитах голотурии *E. fraudatrix* в контроле и при воздействии ТсТҮр *in vitro*. (а) – фрагментация ДНК в свежевыделенных (0 ч) фагоцитах и через 24 ч инкубации. Стрелочками указаны маркеры молекулярной массы ДНК (п.н.); (б) – микрофотографии ядер свежевыделенных фагоцитов, окрашенных Hoechst 33342. Левая панель – Ф1 фагоциты, правая – Ф2 фагоциты. Здесь и далее увеличение $\times 200$, масштаб: 20 мкм; (в) – % ядер с конденсацией хроматина в свежевыделенных фагоцитах; (г) и (д) – микрофотографии ядер Ф1 и Ф2 фагоцитов, окрашенных Hoechst 33342, через 1 (г) и 24 (д) инкубации с ТсТҮр (0, 0.2, 0.5, 2 мкг/мл); (е) – % ядер с конденсацией хроматина в Ф1 и Ф2 фагоцитах при воздействии ТсТҮр через 1 ч; (ж) – % ядер с конденсацией хроматина в Ф1 и Ф2 фагоцитах при воздействии ТсТҮр через 24 ч. * – $P < 0.05$ по сравнению с контролем.

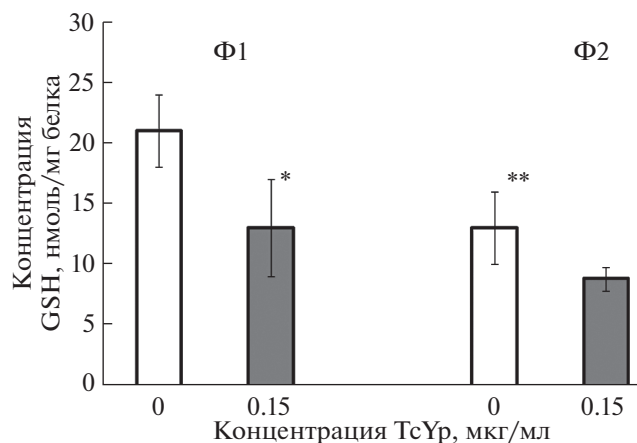


Рис. 2. Влияние ТсТУр на концентрацию GSH в Φ1 и Φ2 фагоцитах через 24 ч инкубации. * – $P < 0.05$ по сравнению с контролем; ** – $P < 0.05$ по сравнению с Φ1.

Влияние ТсТУр на уровень GSH. Существует тесная связь между уровнем антиоксидантной защиты и развитием апоптоза (Jeong, Joo, 2016), и уровень GSH в клетках является ключевым звеном в поддержании оксидантно-антиоксидантного баланса (Fraternal *et al.*, 2017). Различный уровень GSH в макрофагах двух типов связан с регуляцией их метаболизма (Peterson *et al.*, 1998). Для выявления значения GSH в развитии апоптоза фагоцитов голотурии было определено влияние ТсТУр в концентрации 0.15 мкг/мл на содержание GSH в двух типах фагоцитов. Концентрация GSH в Φ1 фагоцитах через 24 ч инкубации была в 1.6 раза выше, чем в Φ2 фагоцитах. При этом ТсТУр вызывал снижение уровня GSH (в 1.6 раза) в Φ1, но не в Φ2 фагоцитах, где отмечена лишь тенденция к снижению (рис. 2).

Влияние ТсТУр на жизнеспособность фагоцитов. Несмотря на различные тенденции в изменениях апоптоза в Φ1 и Φ2 фагоцитах при воздействии ТсТУр через 24 ч, жизнеспособность обоих типов фагоцитов при действии ТсТУр не изменялась или даже имела тенденцию к возрастанию по сравнению с контролем. Так, жизнеспособность Φ1 фагоцитов через 24 ч при концентрациях ТсТУр 0.2 и 0.5 мкг/мл имела тенденцию к снижению по сравнению с контролем, а при концентрации 2 мкг/мл была достоверно повышена.

В Φ2 фагоцитах отмечено достоверное возрастание жизнеспособности по сравнению с контролем только при 0.2 мкг/мл ТсТУр, а с возрастанием концентрации отмечена тенденция к снижению жизнеспособности (рис. 3).

Характеристика фенотипов фагоцитов Φ1 и Φ2 в норме и при воздействии ТсТУр. Как свидетельствуют микрофотографии клеток, окрашенных ФИТЦ-мечеными лектинами (рис. 4) и результа-

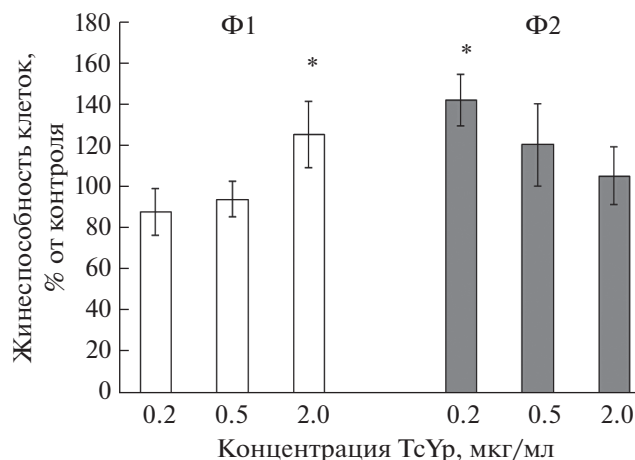


Рис. 3. Жизнеспособность Φ1 и Φ2 фагоцитов при воздействии ТсТУр через 24 ч инкубации. * – $P < 0.05$ по сравнению с контролем.

ты определения процентного содержания окрашенных лектинами клеток (рис. 5а), среди свежeweделенных фагоцитов Φ1 и Φ2 меченые соn A клетки обнаружены в одинаковой пропорции. Уровни связывания соn A сохранялись одинаковыми для двух типов клеток в различные сроки инкубирования, при этом они не изменялись по сравнению со свежeweделенными клетками через 1 ч, но значительно снижались, более чем в 2 раза, через 24 ч.

Для DBA в свежeweделенных фагоцитах отмечена тенденция к более низкому связыванию Φ2 фагоцитами по сравнению с таковым Φ1 клетками. В последующие сроки инкубации эта разница становилась достоверной.

Свежeweделенные Φ1 фагоциты связывали SBA в самой низкой пропорции по сравнению с другими изученными лектинами. При этом связывание в Φ2 фагоцитах было значительно выше, чем в Φ1. Уровень связывания SBA в Φ1 фагоцитах возрастал через 1 ч инкубации в 2 раза, но к 24 ч возвращался к исходному значению. В Φ2 фагоцитах уровень связывания лектина, напротив, не изменялся через 1 ч инкубации, а к 24 ч возрастал в 2.4 раза по сравнению с уровнем в свежeweделенных фагоцитах.

Для PNA также отмечена тенденция к более высокому уровню связывания в свежeweделенных Φ2 фагоцитах по сравнению с таковым в Φ1. Через 1 ч эта разница становилась достоверной (четырёхкратное превышение в Φ2 фагоцитах по сравнению с Φ1 клетками). Однако через 24 ч соотношение связывания PNA в Φ1 и Φ2 фагоцитах менялось на противоположное, и уровень связывания в Φ2 фагоцитах был в 1.5 раза ниже, чем в Φ1 клетках.

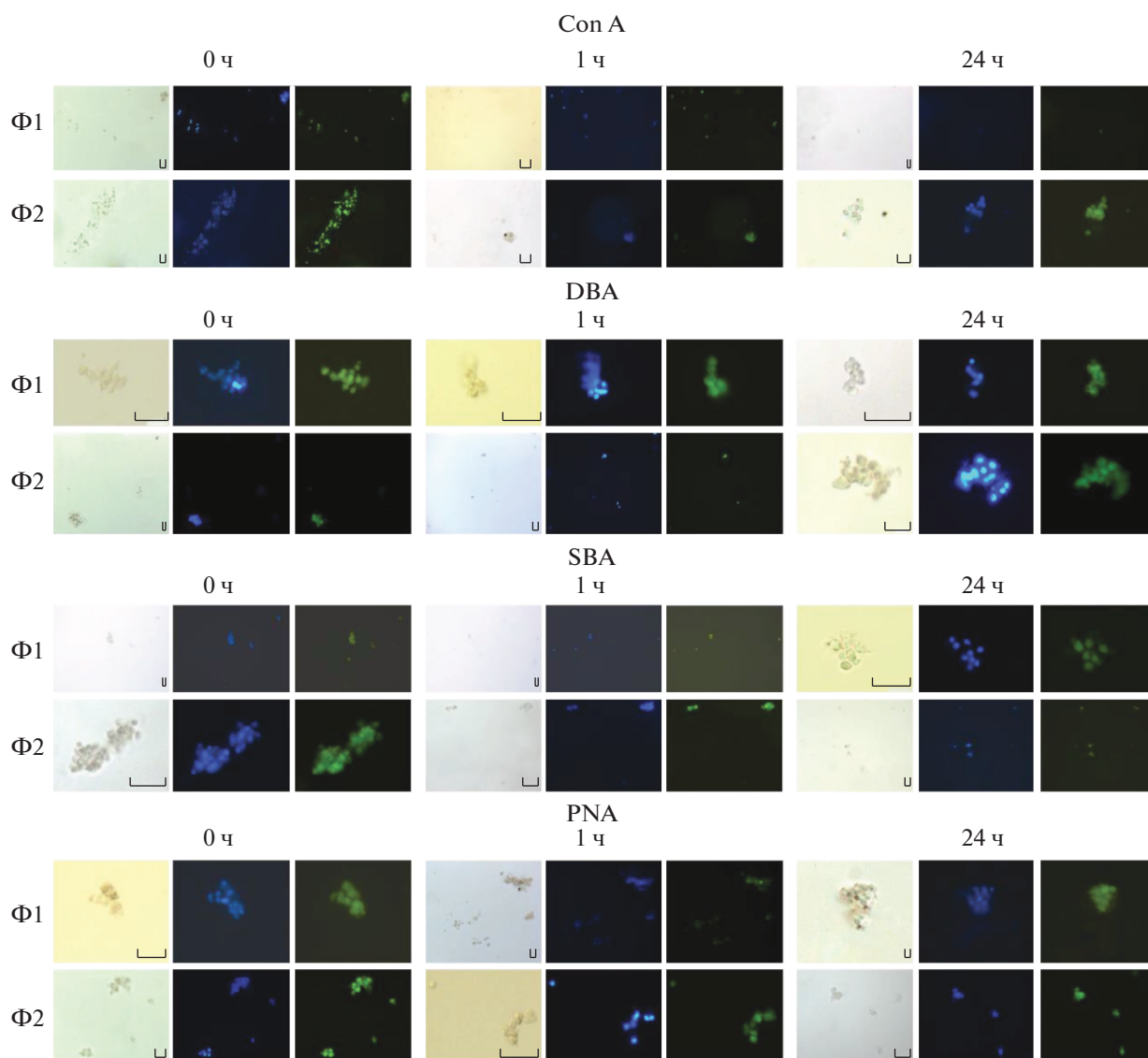


Рис. 4. Микрофотографии свежевыделенных (0 ч) и контрольных (1 и 24 ч инкубации) фагоцитов, окрашенных ФИТЦ-мечеными лектинами, в проходящем свете и при зеленой флуоресценции, а также ядер фагоцитов, окрашенных DAPI (синяя флуоресценция).

Введение в инкубационную среду ТсГҮр вызывало изменения в связывании растительных лектинов, которое зависело как от концентрации ТсГҮр, так и от времени его воздействия и типа фагоцитов (рис. 5б). Так, через 1 ч ТсГҮр в самой низкой концентрации (0.2 мкг/мл) не оказывал влияния на связывание соп А по сравнению с контролем ни в одном типе фагоцитов. В концентрации 0.5 мкг/г ТсГҮр в этот же период значительно снижал уровень связывания кон А также в обоих типах фагоцитов, а при концентрации 2 мкг/мл в обоих типах фагоцитов отмечена тенденция к возвращению (в Ф1) или возвращение (в Ф2) к контрольному уровню. Однако через 24 ч ТсГҮр стимулировал связывание соп А в Ф1 фагоцитах в прямой концентрации-

онной зависимости, но не оказывал влияния в Ф2 фагоцитах. Таким образом изменения, вызываемые ТсГҮр, были сходны в Ф1 и Ф2 фагоцитах через 1 ч инкубации, но через 24 ч они приобретали противоположную направленность по сравнению с одночасовым периодом в Ф1 фагоцитах, а в Ф2 типе клеток связывание соп А возвращалось к контрольному уровню.

На связывание DBA ТсГҮр (0.2–0.5 мкг/мл) оказывал ингибирующее действие в Ф1 фагоцитах уже в концентрации 0.2 мкг/мл как через 1 ч, так и через 24 ч инкубации. На связывание DBA в Ф2 фагоцитах ТсГҮр не оказывал влияния ни в один из периодов инкубации.

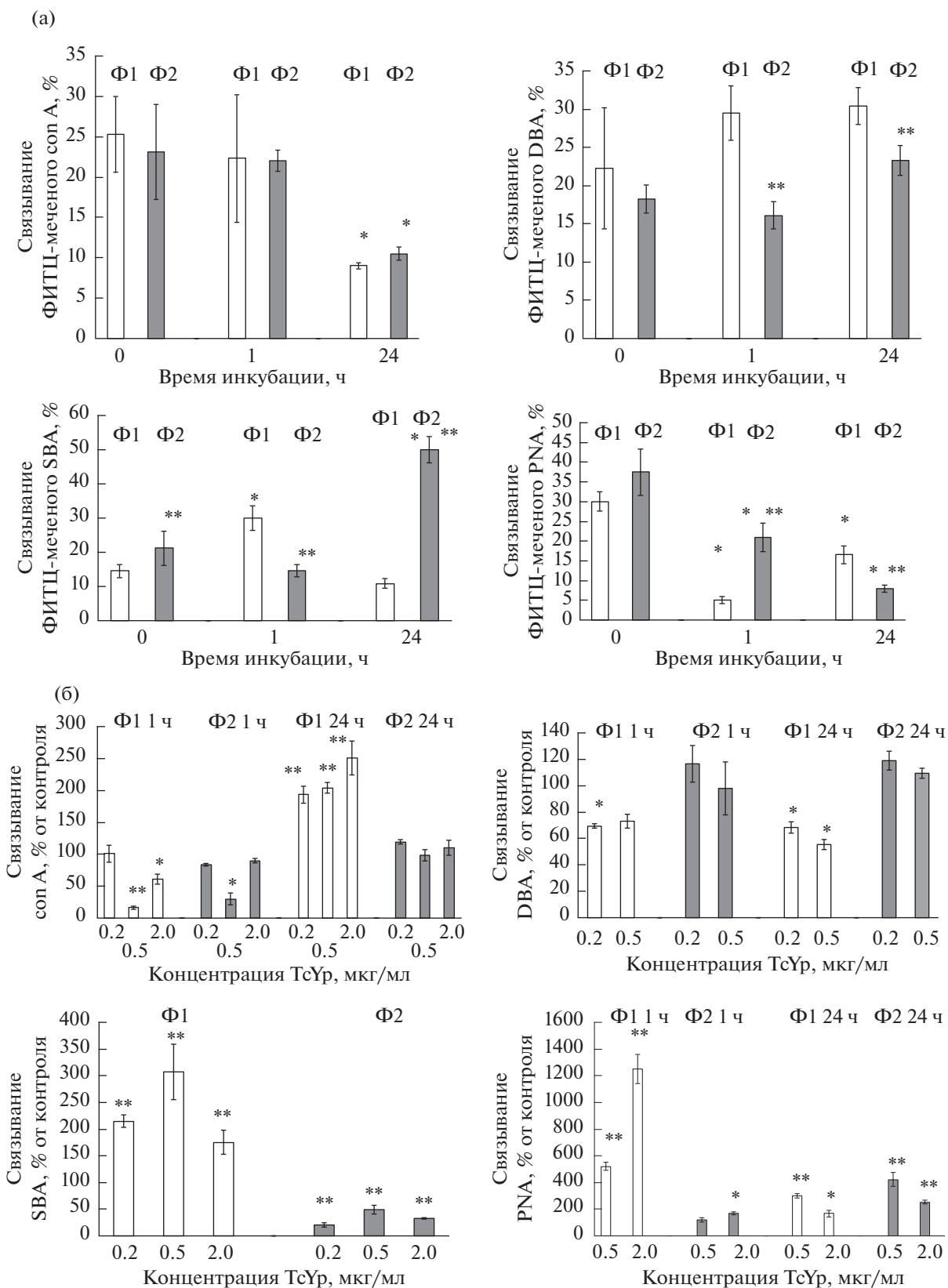


Рис. 5. (а) – доля (%) фагоцитов Φ1 и Φ2, связывающих растительные лектины соп А, DBA, SBA и PNA в свежесыведенных и контрольных инкубируемых фагоцитах; (б) – доля (%) фагоцитов Φ1 и Φ2 (по отношению к контролю), связывающих растительные лектины при воздействии ТсУр после 1 и 24 ч инкубации. * – $P < 0.05$ по сравнению с контролем; ** – $P < 0.01$ по сравнению с контролем.

Таким образом, ТсТур влиял на экспрессию рецепторов к *сop A* и *DVA* преимущественно в Ф1 фагоцитах, но не в Ф2 клетках.

При этом через 24 ч инкубации ТсТур стимулировал связывание *SBA* в Ф1 фагоцитах, максимально при 0.5 мкг/мл, но ингибировал в Ф2 клетках (максимально – при 0.2 мкг/мл). Таким образом, связывание в Ф1 и Ф2 фагоцитах этого лектина, по уровню которого два типа свежeweделенных и контрольных фагоцитов максимально отличались, при действии ТсТур имело противоположную направленность.

Напротив, изменения в связывании фагоцитами двух типов РНА под действием ТсТур носили односторонний характер. ТсТур (0.5–2 мкг/мл) вызывал в них возрастание связывания в прямой концентрационной зависимости через 1 ч и в обратной концентрационной зависимости через 24 ч инкубации. Однако интенсивность связывания лектина рецепторами Ф1 фагоцитов снижалась через 24 ч по сравнению с 1 ч, а связывание Ф2 фагоцитами через 24 ч было выше, чем через 1 ч.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что макрофаги находятся на первой линии защиты от бактериальных инфекций, и важнейшей их реакцией является синтез продуктов, убивающих бактерии – АФК, прежде всего, супероксиданиона и оксида азота (Brune *et al.*, 2013). Однако продукция этих агрессивных молекул опасна и для самой клетки, поскольку увеличение синтеза АФК часто коррелирует с развитием апоптоза и последующей гибелью клетки. При этом в отношении влияния на апоптоз иммунных клеток хозяина бактерии используют различные стратегии выживания: у некоторых бактерий она направлена на выживание внутри клеток хозяина, и отмечена прямая зависимость вирулентности от их способности ингибировать апоптоз, у других, напротив, отмечено распространение инфекции в организме благодаря гибели макрофагов путем апоптоза. При этом отмечается, что одна и та же бактерия может использовать разные стратегии на различных стадиях инфекции (Aguiló *et al.*, 2013).

Показано, что иерсинии могут использовать стратегию колонизации новых клеток хозяина, индуцируя апоптоз (Mopack, Falkow, 2000), и эффекторный белок системы секреции III типа (T3SS) фактор вирулентности YopJ может участвовать в реализации механизмов индукции апоптоза (Zhang *et al.*, 2005). Токсины иерсиний также играют роль в вирулентности бактерий (Ценева и др., 2002), но механизмы их влияния мало изучены.

Исследования фрагментации ДНК и конденсации хроматина в настоящей работе выявили, что в свежeweделенных Ф1 фагоцитах уровень апоптоза был значительно ниже, чем в Ф2 фаго-

цитах. Сходным образом, более низкая чувствительность к апоптозстимулирующим факторам отмечена в М1 макрофагах по сравнению с М2 типом клеток (Kurian, Cunoosamy, 2014). Такое соотношение уровней апоптоза в двух типах фагоцитов сохранялось в контроле и в последующие сроки инкубации.

Введение ТсТур в среду инкубации увеличивало разницу между уровнем апоптоза в Ф1 и Ф2 фагоцитах в пользу последних, как через 1 ч, так и через 24 ч концентрационно-зависимым образом. Особенно выражена была разница (в 5 раз) через 24 ч при концентрации ТсТур 0.5 мкг/мл. Асимметричное действие на апоптоз макрофагов, с повышением в М2 макрофагах по сравнению с таковым в М1 типе, отмечается также при действии некоторых бактерий (Atri *et al.*, 2018).

Ранее было показано, что Ф1 фагоциты голотурии обладают более высоким уровнем продукции АФК (супероксиданионрадикала и оксида азота), чем Ф2 фагоциты, а ТсТур снижал продукцию АФК именно в Ф1 фагоцитах (Долматова и др., 2019). Снижение уровня апоптоза в Ф1 клетках, обнаруженное в настоящей работе, по-видимому, учитывая связь между продукцией АФК и апоптозом (Aguiló *et al.*, 2013; Brune *et al.*, 2013), является следствием снижения оксидантного стресса в Ф1 и подтверждает ранее высказанное (Долматова и др., 2019) предположение о том, что ТсТур снижает киллерную активность наиболее микробицидного типа фагоцитов голотурии.

Известно, что *Y. pseudotuberculosis* вызывает сдвиг поляризации макрофагов по М2 пути, и в этом процессе могут участвовать YopJ или другие еще не установленные факторы. Такой сдвиг приводит к снижению бактерицидной активности макрофагов и, по-видимому, играет важную роль в иммуносупрессивной стратегии *Y. pseudotuberculosis* (Bi *et al.*, 2012). ТсТур способен вызывать сдвиг в функциональной активности фагоцитов голотурии также в пользу преобладания менее бактерицидного типа, что свидетельствует о том, что он может быть одним из факторов, обеспечивающих вирулентность бактерии для голотурий. Кроме того, эти данные свидетельствуют в пользу высказанного ранее предположения о том, что Ф1 и Ф2 фагоциты являются аналогами М1 и М2 макрофагов (Dolmatova, Dolmatov, 2018; Долматова и др., 2019). О том, что фагоциты голотурий могут приобретать М2-подобный фенотип, свидетельствуют также данные об обнаружении стимуляций аргиназы различными стимулами в макрофагах без участия синтезируемых Th2 цитокинов IL-4/IL-13 (Dzik, 2014), что свидетельствует об эволюционно древнем механизме регуляции иммунного ответа, связанном с активацией аргиназы.

Вместе с тем, необходимо отметить, что функциональная разница между M1 и M2 макрофагами основана на разных метаболических путях получения энергии (Dolmatova, Dolmatov, 2020), в регуляции которых участвует GSH. Он является главным небелковым тиолом, отвечающим за поддержание клеточного гомеостаза и окислительно-восстановительного баланса (Morris *et al.*, 2013). При этом в M1 макрофагах концентрация GSH превышает таковую в M2 макрофагах, а снижение уровня GSH способствует поляризации макрофагов в сторону M2 типа (Peterson *et al.*, 1998).

Ранее было показано, что уровень антиоксидантной ферментативной активности значительно выше в контрольных Ф1 фагоцитах по сравнению с таковым в Ф2 типе, и также значительно выше в Ф1 фагоцитах была активность глутатионредуктазы (ГР) через 24 ч действия ТсТур (Долматова и др., 2019). Поскольку ГР обеспечивает восстановление пула GSH при оксидантном стрессе (Чеснокова и др., 2006), это свидетельствовало в пользу предположения о поддержании концентрации GSH в Ф1 фагоцитах на более высоком уровне, чем в Ф2. Проверка этого предположения в настоящей работе показала, что через 24 ч инкубации в отсутствие ТсТур уровень GSH в Ф1 фагоцитах двукратно превышал таковой в Ф2 фагоцитах, при этом ТсТур в минимальной концентрации снижал уровень GSH в Ф1 до такового в Ф2, но не влиял на содержание GSH в Ф2 по сравнению с контролем. Таким образом, фагоциты Ф1 содержат GSH в значительно большей концентрации, чем в Ф2 клетках, при этом при воздействии ТсТур этот показатель меняется до уровня, характеризующего Ф2 фагоциты, что также свидетельствует в пользу наличия метаболического сдвига Ф1 фагоцитов в сторону Ф2 клеток. Снижение уровня GSH происходит и в макрофагах при действии ряда бактерий (Morris *et al.*, 2013), что приводит к увеличению их выживаемости в клетках хозяина (Cao *et al.*, 2018).

Исследования связи между уровнем GSH и смертью клетки показали, что в различных типах клеток недостаток GSH может сопровождаться апоптозом, некрозом и аутофагией (Sun *et al.*, 2018). В настоящей работе в диапазоне концентраций ТсТур 0.2–2 мкг/мл не отмечено возрастания апоптоза через 24 ч в Ф1 фагоцитах, поэтому снижение уровня GSH, по видимому, не стимулировало гибель клеток по апоптотическому пути. В то же время значительно более низкая концентрация GSH и более высокий уровень апоптоза в Ф2 по сравнению с таковыми в Ф1 свидетельствуют в пользу ранее высказанного предположения о том, что эти клетки более чувствительны к дефициту GSH, который может влиять на возрастание в Ф2 фагоцитах апоптоза (Dolmatova, Dolmatov, 2018).

Не было выявлено также положительной корреляции между жизнеспособностью и апоптозом фагоцитов, при этом зависимость жизнеспособности от концентрации ТсТур носила в двух типах фагоцитов противоположный характер.

Необходимо принять во внимание, что различные механизмы смерти могут осуществляться в клетке одновременно и блокирование одного типа может стимулировать другой путь (Mariño *et al.*, 2014). Аутофагия и апоптоз являются функционально различными механизмами для удаления или разрушения цитоплазматических структур внутри клетки или клеток внутри организма, соответственно. Аутофагия может защищать клетки от апоптоза и способствовать очищению от апоптотических клеток путем эффероцитоза. При этом активация аутофагии приводит к поляризации макрофагов по 2-му типу (Haloul *et al.*, 2019). По аналогии с макрофагами, на основании отсутствия связи между апоптозом и уровнем GSH и жизнеспособностью, и при этом выявленной трансформацией Ф1 фагоцитов в сторону приобретения функциональных черт Ф2 типа, можно предположить, что преобладающим механизмом смерти Ф1 фагоцитов при действии ТсТур является аутофагия. Необходимы дальнейшие исследования по влиянию ТсТур на различные виды смерти клеток для понимания механизмов его действия на фагоциты.

Макрофаги M1 и M2 отличаются между собой не только функционально, но и фенотипически. M1 макрофаги имеют, в частности, такие поверхностные маркеры, как CD80, CD86, CD14, а M2 макрофаги-CD206 (Bi *et al.*, 2012; Dolmatova, Dolmatov, 2020). Инфицирование *Y. pseudotuberculosis* снижало экспрессию CD80 и CD86 макрофагами, что соответствовало представлению о преобладании M2 типа в популяции макрофагов (Bi *et al.*, 2012). По-видимому, оценка маркеров фагоцитов Ф1 и Ф2 также может быть полезной для оценки механизма действия ТсТур.

Фагоциты беспозвоночных (как и позвоночных) экспрессируют рецепторы к лигандам, находящимся на поверхности микробов. Однако проблема фенотипирования фагоцитов беспозвоночных является на сегодняшний день нерешенной, у беспозвоночных не выявлены маркеры, схожие с таковыми у позвоночных, а возможности типирования разных субпопуляций/типов фагоцитов недостаточно исследованы. Наиболее часто используемый подход к изучению маркеров поверхности фагоцитов беспозвоночных – использование меченых флуоресцентным красителем растительными лектинами, связывающихся с определенными углеводными остатками белков на поверхности клеток. Многие лектины избирательно связываются с клетками представителей разных таксонов и видов. На примере *Mytilus edulis* было установлено,

что некоторые субпопуляции фагоцитов красились разными лектинами в зависимости от размеров гранул клеток (Pipe, 1990), что указывало на возможность фенотипирования отдельных типов лейкоцитов.

При этом необходимо отметить, что связывание того или иного растительного лектина с разными типами фагоцитов не носило уникальный характер, и разные типы фагоцитов отличались лишь по степени экспрессии лигандов для этих лектинов, как это отмечено и для фенотипических маркеров M1 и M2 макрофагов (Сахно и др., 2015), что, по-видимому, связано с пластичностью состояния фагоцитов.

В данной работе показано, что у голотурии *E. fraudatrix* свежевыделенные фагоциты Ф1 и Ф2 связывают некоторые растительные лектины с разной интенсивностью, при этом доли связывающих con A и PNA Ф1 и Ф2 фагоцитов достоверно не отличались. Однако фагоциты отличались между собой по связыванию SBA (связывание в Ф2 было значительно выше, чем в Ф1) и DBA (тенденция к повышению уровня связывания в Ф1 по сравнению с Ф2 клетками). Эти данные сходны с ранее полученными результатами (Dolmatova, Dolmatov, 2018), за исключением данных об экспрессии рецепторов к SBA, которая в указанной работе была выше в Ф1 фагоцитах по сравнению с Ф2 клетками. Основываясь на этих данных, характеристики связывания DBA клетками двух типов можно считать наиболее постоянными, и соотношение в экспрессии рецепторов с GalNAc-остатками может быть использовано для маркирования двух типов фагоцитов.

При этом степень различия в экспрессии рецепторов к DBA, SBA и PNA, но не con A как между двумя типами клеток, так и по сравнению с таковыми в свежевыделенных клетках, возрастала уже через 1 ч инкубации.

При инкубации с TcTyр выраженность экспрессии поверхностных рецепторов к лектинам менялась, а направленность изменений во многих случаях носила противоположный характер в двух типах фагоцитов. Так, для con A соотношение в долях связывания двумя типами фагоцитов изменялось только через 24 ч, с преимущественным увеличением в Ф1 фагоцитах, что свидетельствует о том, что происходил сдвиг в связывании этого лектина преимущественно Ф1 фагоцитами как по сравнению со свежевыделенными фагоцитами, так и по сравнению с одночасовым периодом воздействия TcTyр. Соотношение же долей связывания DBA в двух типах фагоцитов при действии TcTyр менялось на противоположное по сравнению с контролем (снижение доли в Ф1 при неизменности в Ф2), менялось также на противоположное по сравнению с контролем соотноше-

ние долей связывания SBA двумя типами фагоцитов (возрастание в Ф1 и снижение в Ф2),

Соотношение связывания PNA в двух типах фагоцитов, в отличие от такового для con A, через 24 ч не менялось, но через 1 ч носило характер, противоположный контрольному (возрастание экспрессии в Ф1, но не в Ф2). Таким образом, TcTyр индуцировал приобретение фагоцитами Ф1 фенотипических черт, свойственных Ф2 фагоцитам в отношении связывания DBA и PNA, без изменения фенотипа Ф2. При этом он вызывал приобретение обоими типами фагоцитов фенотипической особенности противоположного типа клеток в отношении связывания SBA. Ранее было показано, что при воздействии TcTyр в обоих типах фагоцитов происходило изменение уровня их маркеров (оксида азота и активности аргиназы) в сторону приобретения признаков другого типа клеток, что сопровождалось функциональной стимуляцией преимущественно фагоцитов второго типа (Долматова и др., 2019). Полученные данные свидетельствуют о том, что TcTyр меняет не только функциональные, но и фенотипические маркеры Ф1 и Ф2 фагоцитов, стимулируя появление у Ф1 фагоцитов особенностей Ф2 клеток.

Сравнение уровней апоптоза в двух типах контрольных фагоцитов и экспрессии поверхностных рецепторов к DBA свидетельствует о том, что окраска лектином не была избирательна по отношению к апоптотическим клеткам, более того, лектин связывался в большей степени с Ф1 клетками, в которых апоптоз был менее выражен, чем в Ф2 фагоцитах. Однако изменение соотношения экспрессии поверхностных рецепторов фагоцитов к DBA при воздействии TcTyр соответствовало динамике соотношения апоптоза в обоих типах клеток, лектин связывался в большей мере с клетками с наибольшим уровнем апоптоза. В то же время экспрессия рецепторов фагоцитов к SBA была значительно больше в клетках с наиболее выраженным апоптозом в свежевыделенных фагоцитах, но при воздействии TcTyр наибольший уровень связывания лектина происходил в клетках с наименьшим уровнем апоптоза. Такие изменения в определенной мере соответствуют существующей концепции о том, что DBA является апоптотическим, а SBA-антиапоптотическим маркером клеток (Dini *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2014).

Предполагается, что рецепторы, содержащие маннанные остатки, связаны с реализацией апоптоза, а сами остатки являются маркерами апоптотических клеток (Shi *et al.*, 2017). При этом есть данные, что при реализации аутофагии также экспрессируются маннанные остатки (Lai *et al.*, 2015). Возможно, что особенности связывания con A с фагоцитами обусловлены не столько апоптозом, сколько аутофагией клеток, обеспечивающей жизнеспособность клеток. В пользу этого

предположения свидетельствует сходство динамики жизнеспособности клеток с динамикой экспрессии рецепторов к *сop A*.

Ранее Секо-Ровира с соавт. (*Seco-Rovira et al.*, 2013) выявили аффинность PNA к апоптотическим макрофагам. Однако в настоящей работе не обнаружено определенной зависимости между связыванием PNA фагоцитами двух типов и развитием в них апоптоза при действии TcTyr, что, наряду со слабой изученностью участия рецепторов с Gal β 1–3GalNAc-остатками в развитии апоптоза, не позволяет сделать вывод о значении этих рецепторов в механизмах действия TcTyr в фагоцитах голотурии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе продемонстрированы особенности концентрационно-зависимого (0,2–2 мкг/мл) и зависящего от времени (1 ч и 24 ч) действия термостабильного токсина бактерии *Y. pseudotuberculosis* на апоптоз в двух типах фагоцитов голотурии *E. fraudatrix* и оценена возможная роль апоптоза в механизмах гибели фагоцитов при действии TcTyr. Установлено, что в Ф1 фагоцитах уровень апоптоза был значительно ниже, чем в Ф2, как в свежeweделенных клетках, так и при инкубации. Добавление TcTyr вызывало разнонаправленные изменения в апоптозе Ф1 и Ф2 фагоцитов, с преимущественным ингибированием его уровня в Ф1 и возрастанием в Ф2 фагоцитах, различия были наиболее выражены через 24 ч инкубации, при концентрации TcTyr 0,5 мкг/мл. Учитывая тесную связь апоптоза с функциональной активностью клеток, эти данные свидетельствуют о преимущественной активации Ф2 фагоцитов. При этом значительное превышение содержания GSH в интактных Ф1 фагоцитах по сравнению с таковым в Ф2 типе соответствует представлениям об апоптоз-протекторной роли GSH в клетках и указывает на наличие различий в метаболизме двух типов фагоцитов. Однако при действии TcTyr снижение концентрации GSH в Ф1, но не Ф2 свидетельствовало о том, что изменения в уровне апоптоза в Ф1 клетках при воздействии токсина не зависели напрямую от уровня GSH. Сходным образом, не установлено закономерности в зависимости жизнеспособности Ф1 и Ф2 фагоцитов от колебаний апоптоза в клетках. По-видимому, TcTyr способен включать в фагоцитах другие механизмы клеточной смерти, направленные на преимущественное выживание Ф2 фагоцитов.

Исследование с помощью ФИТЦ-меченых растительных лектинов особенностей экспрессии поверхностных клеточных рецепторов интактных и контрольных фагоцитов выявило сходный уровень экспрессии рецепторов к *сop A* и PNA в двух типах фагоцитов. Однако выявлены различия в экспрессии рецепторов к DBA и SBA, уровень ко-

торой был выше в Ф1 фагоцитах по сравнению с Ф2 для первого лектина и, наоборот, ниже в Ф1 фагоцитах для второго, что говорит о возможности использования этих лектинов для маркирования двух типов фагоцитов. Инкубация фагоцитов с TcTyr вызывала изменения в соотношении уровней экспрессии к лектинам в двух типах фагоцитов, что свидетельствует о том, что фагоциты Ф1 приобретают фенотипические признаки Ф2 фагоцитов, а в отношении экспрессии рецепторов к SBA оба типа фагоцитов приобретали фенотип, характерный для другого типа клеток. Анализ направленности изменений в связывании лектинов клетками позволяет сделать вывод о том, что TcTyr вызывал преимущественно трансформацию фенотипа Ф1 фагоцитов в Ф2 фенотип.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о наличии функциональных и фенотипических различий между Ф1 и Ф2 фагоцитами, которые, вместе с ранее полученными данными о том, что маркером Ф1 фагоцитов является оксид азота, а Ф2 фагоцитов – активность аргиназы, позволяют сделать вывод о том, что Ф1 и Ф2 фагоциты играют различную роль в иммунном ответе, подобно M1 и M2 макрофагам позвоночных.

При этом действие TcTyr было направлено на снижение функциональной активности фагоцитов Ф1 и увеличение активности Ф2 фагоцитов без снижения их жизнеспособности, со сдвигом фенотипа Ф1 фагоцитов в сторону приобретения фенотипа, свойственного Ф2 типу клеток. Вместе с ранее установленным фактом о повышенном уровне синтеза АФК в Ф1 по сравнению с Ф2 фагоцитами, это свидетельствует о способности TcTyr снижать активность наиболее микробицидных фагоцитов и увеличивать жизнеспособность иммунных клеток хозяина, что, по аналогии с макрофагами позвоночных, связано со стратегией выживаемости бактерий. Таким образом, TcTyr является важным фактором перепрограммирования фагоцитов голотурий в сторону преобладания противовоспалительного типа, что может увеличивать вирулентность *Y. pseudotuberculosis* для голотурий.

В целом, установленные механизмы воздействия TcTyr на два типа фагоцитов голотурии свидетельствуют о наличии сходства некоторых клеточных механизмов иммуносупрессии, вызываемой *Y. pseudotuberculosis*, у голотурий и позвоночных.

Дальнейшие исследования нужны для исследования механизмов клеточной гибели у голотурий при действии TcTyr, что может быть полезно для моделирования эффектов TcTyr и разработки препаратов, таргетированных на подавление вирулентности *Y. pseudotuberculosis*.

Работа выполнена в рамках госзадания Министерства науки и высшего образования РФ (AAAA-A17-117030110038-5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гнедкова И.А., Лисяный Н.И., Станецкая Д.Н., Розуменко В.Д., Главацкий А.Я., Шмелева А.А., Малышева Т.А., Черненко О.Г., Гнедкова М.А. Лектинсвязывающие и туморогенные свойства клеток глиомы С6 // Онкология. 2015. Т. 17. С. 4–11.
- Долматова Л.С., Заика О.А. Апоптозмодулирующее действие простагландина Е2 в целомочитах голотурии *Eupentacta fraudatrix* зависит от антиоксидантного ферментного статуса клеток // Изв. РАН. Сер. биол. 2007. № 2. С. 273–282.
- Долматова Л.С., Уланова О.А., Тимченко Н. Ф. Термостабильный токсин бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* дизрегулирует функциональную активность двух типов фагоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Изв. РАН. Сер. биол. 2019. № 2. С. 115–126.
- Сахно Л.В., Шевела Е.Я., Черных Е.Р. Фенотипические и функциональные особенности альтернативно активированных макрофагов: возможное использование в регенеративной медицине // Иммунология. 2015. Т. 36. С. 242–246.
- Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова–Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004. 219 с.
- Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний // КМАХ. 2002. № 3. Т. 4. С. 248–266.
- Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах // Успехи соврем. естествознания. 2006. № 7. С. 29–36.
- Aguiló N., Marinova D., Martín C., Pardo J. ESX-1-induced apoptosis during mycobacterial infection: to be or not to be, that is the question // Front. Cell Infect. Microbiol. 2013. V. 3. P. 88.
- Atri Ch., Guerfali F.Z., Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases // Int. J. Mol. Sci. 2018. 19. 1801.
- Bi Y., Wang X., Han Y., Guo Z., Yang R. *Yersinia pestis* versus *Yersinia pseudotuberculosis*: effects on host macrophages // Scand. J. Immunol. 2012. V. 76. P. 541–551.
- Brune B., Dehne N., Grossmann N., Jung M., Namgaladze D., Schmid T., von Knethen, A., Weigert A. Redox control of inflammation in macrophages // Antioxid. Redox. Signal. 2013. V. 19. P. 595–637.
- Cao R., Teskey G., Islamoglu H., Abraham R., Munjal S., Gyurjian K., Zhong L., Venketaraman V. Characterizing the effects of glutathione as an immunoadjuvant in the treatment of tuberculosis // Antimicrob. Agents Chemother. 2018. 62:e01132–18.
- Chia F.-S., Xing J. Echinoderm coelomocytes // Zool. Studies. 1996. V. 35. P. 231–254.
- Danilova N. The evolution of immune mechanisms // J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.). 2006. V. 306B. P. 496–520.
- Dini L., Falasca L., Lentini A., Mattioli P., Piacentini M., Piredda L., Autuori F. Galactose-specific receptor modulation related to the onset of apoptosis in rat liver // Eur. J. Cell Biol. 1993. V. 61. P. 329–337.
- Dolmatova L.S., Dolmatov I. Yu. Lead induces different responses of two subpopulations of phagocytes in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // J. Ocean Univ. China. 2018. V. 17. P. 1391–1403.
- Dolmatova L.S., Dolmatov I. Yu. Different macrophage type triggering as target of the action of biologically active substances from marine invertebrates // Mar. Drugs. 2020. 18, 37.
- Dolmatova L.S., Eliseykina M.G., Timchenko N.F., Kovaleva A.L., Shitkova O.A. Generation of reactive oxygen species in the different fractions of the coelomocytes of holothurian *Eupentacta fraudatrix* in response to the thermostable toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* in vitro // Chinese J. Oceanol. Limnol. 2003. V. 21. P. 293–304.
- Dzik J.M. Evolutionary roots of arginase expression and regulation. Front. Immunol. 2014. V. 5. P. 544.
- Fraternale A., Brundu S., Magnani M. Glutathione and glutathione derivatives in immunotherapy // Biol. Chem. 2017. V. 398. P. 261–275.
- Fraternale A., Crinelli R., Casabianca A., Paoletti M., Orlandi Ch., Carloni E., Smietana M., Palamara A. Molecules altering the intracellular thiol content modulate NF- κ B and STAT-1/IRF-1 signalling pathways and IL-12 p40 and IL-27 p28 production in murine macrophages // PLoS ONE. 2013. V. 8. № 3. Article ID e57866.
- Haloul M., Oliveira E.R.A., Kader M., Wells J.Z., Tomimello T.R., El Andaloussi A., Yates C.C., Ismail N. mTORC1-mediated polarization of M1 macrophages and their accumulation in the liver correlate with immunopathology in fatal ehrlichiosis // Scientific Reports. 2019. 9:14050.
- Jeong C.H., Joo S.H. Downregulation of reactive oxygen species in apoptosis // J. Cancer Prev. 2016. V. 21. P. 13–20.
- Kim S.-M., Fujihara M., Sahare M., Minami N., Yamada M., Imai H. Effects of extracellular matrices and lectin *Dolichos biflorus* agglutinin on cell adhesion and self-renewal of bovine gonocytes cultured *in vitro* // Reprod. Fertil. Dev. 2014. V. 26. P. 268–281.
- Komatsu N., Oda T., Muramatsu T. Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and *Pseudomonas* toxin // J. Biochem. 1998. V. 124. P. 1038–1044.
- Kurian N., Cunoosamy D. Differential sensitivity of subsets of monocyte-derived macrophages to apoptosis; its impact on lung inflammation // European Respiratory J. 2014. V. 44: P1470.
- Lai Y., Chuang Y., Chang C., Yeh T.M. Macrophage migration inhibitory factor has a permissive role in concanavalin A-induced cell death of human hepatoma cells through autophagy // Cell Death Dis. 2015. 6(12): e2008.
- Mariño G., Niso-Santano M., Baehrecke E.H., Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis // Nat. Rev. Mol. Cell Bio. 2014. V. 15. P. 81–94.
- McKenzie A.N.J., Preston T.M. Functional studies on *Caliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by

- lectin staining and density centrifugation // *Devel. Compar. Immunol.* 1992. V. 16. P. 19–30.
- Merriman J.A., Klingelhutz A.J., Diekema D.J., Leung D.Y. Novel *Staphylococcus aureus* secreted protein alters keratinocyte proliferation and elicits a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo* // *Biochemistry.* 2015. V. 54. P. 4855–4862.
- Molloy A., Laochumroonvorapong P., Kaplan G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin // *J. Exp. Med.* 1994. V. 180. P. 1499–1509.
- Monack D., Falkow S. Apoptosis as a common bacterial virulence strategy // *Int. J. Med. Microbiol.* 2000. V. 290. P. 7–13.
- Morris D., Carlos Guerra C., Khurasany M., Guilford F., Savio B., Huang Y., Venketaraman V. Glutathione supplementation improves macrophage functions in HIV // *J. Interfer. Cytokine Res.* 2013. V. 33. P. 270–279.
- Netea M.G., Quintin J., van der Meer J.W.M. Trained immunity: a memory for innate host defense // *Cell Host Microbe.* 2011. V. 9. P. 355–361.
- Peterson J.D., Herzenberg L.A., Vasquez K., Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 3071–3076.
- Pipe R. K. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis* // *Cell Tissue Res.* 1990. V. 261. P. 261–268.
- Pramanick D., Forstova J., Pivec L. 4 M guanidine hydrochloride applied to the isolation of DNA from different sources // *FEBS Lett.* 1976. V. 62. P. 81–84.
- Seco-Rovira V., Beltrán-Frutos E., Ferrer C., Sánchez-Huertas M.M., Madrid J.F., Saez F.J., Pastor L.M. 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. P. 974–983.
- Shi Z., Li W.W., Tang Y., Cheng L.J. A novel molecular model of plant lectin-induced programmed cell death in cancer // *Biol. Pharm. Bull.* 2017. V. 40. P. 1625–1629.
- Sun Y., Zheng Y., Wang Ch., Liu Y. Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells // *Cell Death and Disease.* 2018. 9:753.
- Tsai H.C., Wu R. Cholera toxin directly enhances IL-17A production from human CD4+ T cells // *J. Immunol.* 2013. V. 191. P. 4095–4102.
- Zhang Y., Ting A.T., Marcu K.B., Bliska J.B. Inhibition of MAPK and NF-kappa B pathways is necessary for rapid apoptosis in macrophages infected with *Yersinia* // *J. Immunol.* 2005. V. 174. P. 7939–7949.

Effect of a Heat-Stable Toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* on the Functional and Phenotypic Traits of Two Types of Phagocytes in the Holothurian *Eupentacta fraudatrix*

L. S. Dolmatova^{1, #}, O. A. Ulanova¹, and N. F. Timchenko²

¹*Il'yichev Pacific Oceanological Institute, st. Baltiyskaya 43, Vladivostok, 690041 Russia*

²*Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, st. Sel'skaya 1, Vladivostok, 690087 Russia*

[#]*e-mail: dolmatova@poi.dvo.ru*

The impact of a heat-stable toxin of *Yersinia pseudotuberculosis* (HSTYp) on the markers of functional activity and phenotypes of P1- and P2-type phagocytes was studied in the holothurian *Eupentacta fraudatrix*. In the control, P1 and P2 phagocytes differed in the levels of apoptosis and reduced glutathione as well as in the surface receptor binding to some plant lectins. HSTYp (0.2–2 µg/mL) caused a shift in the functional activity indices and phenotype of P1 phagocytes toward the prevalence of those characteristic of P2 type, which has less bactericidal activity. It is supposed that HSTYp is an important factor in the reprogramming of holothurian phagocytes toward the predominance of the anti-inflammatory type, which may increase the virulence of *Y. pseudotuberculosis* for holothurians.