

МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ К РАСТИТЕЛЬНЫМ ЛЕКТИНАМ СТИМУЛЯТОРАМИ ПОЛЯРИЗАЦИИ МАКРОФАГОВ В ФАГОЦИТАХ ГОЛОТУРИИ *EUPENTACTA FRAUDATRIX* ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ РАНЫ

Л.С. Долматова

Тихоокеанский океанологический институт имени В.И. Ильичева ДВО РАН, г. Владивосток

*e-mail: dolmatova@poi.dvo.ru

Голотурии проявляют высокую способность к регенерации утраченных частей тела и эффективному заживлению ран (Долматов и др., 2014). Важную роль в регуляции восстановления тканей играет иммунная система (Юшков, 2017). У позвоночных ведущую роль в этих процессах играют макрофаги, меняющие свой фенотип (M1 или M2) на различных стадиях заживления: M1 тип вносит вклад в реализацию первой провоспалительной фазы, а M2 макрофаги участвуют в дальнейшей стадии восстановления тканей (Wu et al., 2020). Стимуляция макрофагов к поляризации по M1 или M2 пути может быть индуцирована некоторыми препаратами. В частности, поляризацию по M1 пути стимулируют гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) и фактор некроза опухолей (ФНО)- α (Fraternal et al., 2015). Фагоциты голотурий также участвуют в заживлении ран (Ramírez-Gómez et al., 2010), и в частности, при стимуляции заживления новым экстрактом из голотурий (ЭГ) (Долматова, Уланова, 2014). Кроме того, они подразделяются на две субпопуляции: Ф1 и Ф2 фагоциты, которые, подобно M1 и M2 макрофагам, имеют высокий уровень NO или высокую активность аргиназы, соответственно (Dolmatova et al., 2019).

Цель работы: выявление и анализ изменений связывания растительных лектинов с поверхностными рецепторами Ф1 и Ф2 фагоцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* при заживлении ран под воздействием известных стимуляторов поляризации макрофагов и ЭГ.

Материалы и методы

Голотурии *E. fraudatrix* с длиной тела 4-6 см собирали в весенний период в б. Восток (зал. Петра Великого Японского моря). ЭГ получали из тканей голотурии по методу, описанному ранее (Dolmatova et al., 2014). Поверхностный надрез производили скальпелем. Одновременно животным (n=4) вводили с помощью шприца препараты (ГМ-КСФ, ФНО- α , ЭГ) в целомическую полость. Контрольным животным (без ранения) вводили фосфатно-солевой буфер с добавлением 36 g/L NaCl. Через 24 ч у животных отбирали целомическую жидкость, из которой выделяли фагоциты двух типов центрифугированием в градиенте фикола-верографина (Dolmatova et al., 2003). Окрашивание клеток ФИТЦ-мечеными лектинами из *Glycin max* (SBA), *Dolichos biflorus* (DBA) и *Canavalia ensiformis* (con A) проводили по методу, предложенному McKenzie, Preston (1992). Исследование флуоресценции меченых клеток (не менее 100 клеток в каждой повторности) проводили с использованием микроскопа Leica DM 4500 (Wetzlar, Германия). Через 72 ч от начала эксперимента определяли степень заживления раны (длина разреза, сомкнутость краев раны). Различия между группами определяли методом одновариантного анализа (one-way ANOVA) с использованием t-критерия Стьюдента. Разницу между группами считали достоверной при $p < 0.05$.

Поверхностный разрез + инъекция (буферный раствор или препарат)

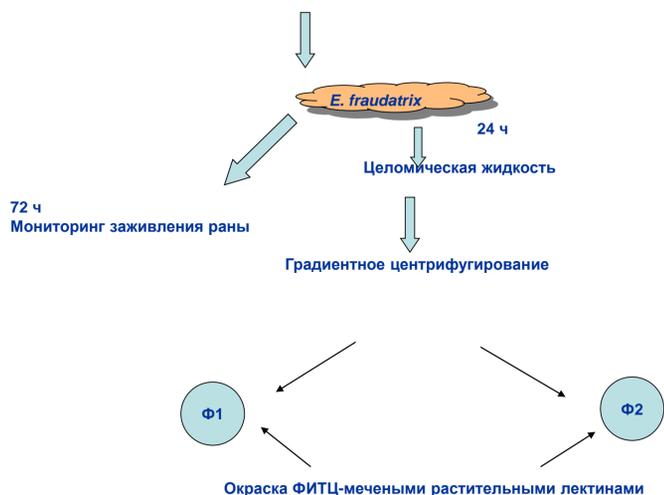


Рис. 1. Схема эксперимента.

Результаты и обсуждение

Свежевыделенные фагоциты Ф1 и Ф2 связывали con A в одинаковой пропорции, при этом отмечена тенденция к более низкому связыванию DBA в Ф2 фагоцитах по сравнению с Ф1 клетками, и, напротив, отмечено достоверно более высокий процент связывающих SBA Ф2 фагоцитов по сравнению с Ф1 клетками (рис. 2-4). Ранение вызвало в Ф1 фагоцитах значительное увеличение связывания con A и тенденцию к снижению связывания SBA. В Ф2 фагоцитах изменение отмечено только в связывании DBA, которое снизилось на 30% (рис. 5).

Поскольку рецепторы к кон А экспрессируются при апоптозе или аутофагии (Seco-Rovira et al., 2013), в ответ на увеличение продукции активных форм кислорода, увеличение связывания этого лектина при ранении свидетельствует об активации Ф1 фагоцитов. Это соответствует данным о том, что ранение у позвоночных увеличивает количество M1 макрофагов (Martins et al., 2020). В то же время снижение связывания SBA, уровень которого находится в прямом соотношении со зрелостью клеток (Krugluger et al., 1990), свидетельствует в пользу представления о том, что в пуле Ф1 фагоцитов в связи с рекрутизацией их в ткани возрастает число незрелых клеток.



Рис. 2. Микрофотографии свежесепарированных фагоцитов Ф1 (верхняя панель) и Ф2 (нижняя панель), окрашенных ФИТЦ-меченым con A, в проходящем свете (левая панель) и при зеленой флуоресценции (правая панель). Масштаб 20 мкм.

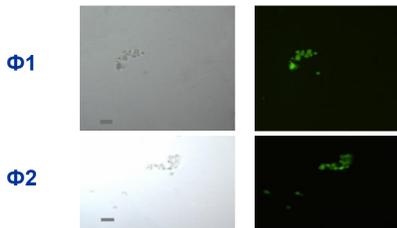


Рис. 3. Микрофотографии свежесепарированных фагоцитов Ф1 (верхняя панель) и Ф2 (нижняя панель), окрашенных ФИТЦ-меченым DBA, в проходящем свете (левая панель) и при зеленой флуоресценции (правая панель). Масштаб 20 мкм.

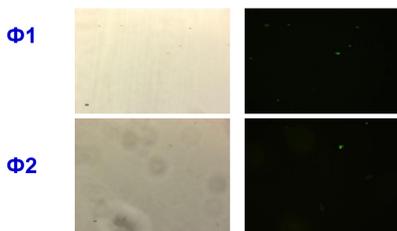


Рис. 4. Микрофотографии свежесепарированных фагоцитов Ф1 (верхняя панель) и Ф2 (нижняя панель), окрашенных ФИТЦ-меченым SBA, в проходящем свете (левая панель) и при зеленой флуоресценции (правая панель). Масштаб 20 мкм.

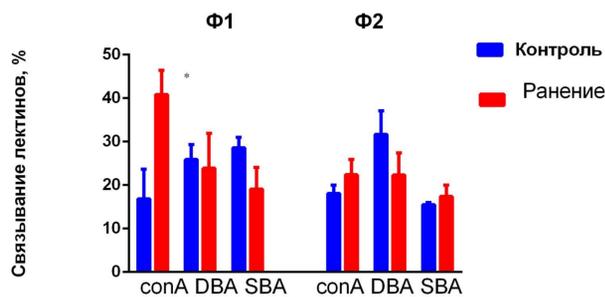


Рис. 5. Доля (%) фагоцитов, связывающих ФИТЦ-меченые растительные лектины через 24 ч после ранения голотурии. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n=4$. * – различия между контрольной и экспериментальной группами статистически значимы при $p < 0.05$.

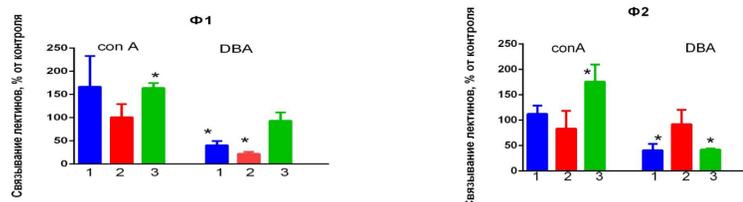


Рис. 6. Доля (%) фагоцитов, связывающих ФИТЦ-меченые растительные лектины через 24 ч после ранения голотурий, которым вводили ГМ-КСФ (1), ФНО- α (2), ЭГ (3). * – различия между контрольной и экспериментальной группами статистически значимы при $p < 0.05$.

ГМ-КСФ значительно снижал связанное с ранением возрастание связывания con A и снижал уровень связывания DBA по сравнению с контролем в фагоцитах Ф1. Отмечена также тенденция к снижению связывания DBA, но не con A, в Ф2 фагоцитах, что может свидетельствовать о трансформации Ф1 фагоцитов под влиянием цитокина в Ф2 тип. Подобные данные о способности ГМ-КСФ вызывать поляризацию моноцитов по M2 пути продемонстрированы на позвоночных. Различные эффекты ГМ-КСФ на поляризацию макрофагов зависят от ряда экспериментальных факторов (Dabritz et al., 2015). ФНО- α также снижал возрастание уровня связывания con A в фагоцитах Ф1 по сравнению с действием одного ранения, но не влиял на его значение в Ф2 фагоцитах. При этом цитокин снижал связывание DBA в Ф1 фагоцитах, но повышал в Ф2 фагоцитах. ЭГ, подобно ГМ-КСФ, снижал влияние ранения на уровень con A в Ф1 фагоцитах, хотя оно оставалось достоверно выше контрольного значения, но стимулировал возрастание связывания con A в Ф2 фагоцитах. В отличие от ГМ-КСФ и ФНО- α , ЭГ не влиял достоверно на связывание DBA в Ф1 и снижал в Ф2 фагоцитах раненых животных по сравнению с эффектом одного ранения (рис. 6).

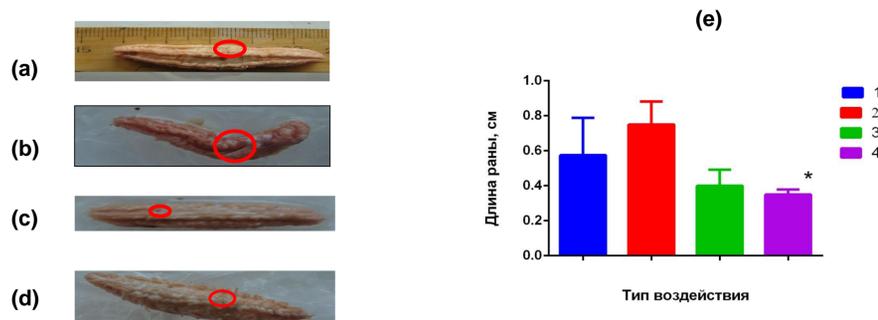


Рис. 7. Влияние препаратов на заживление раны (72 ч от начала эксперимента). (a-d) - фотографии ран: (a) - ранение + буферный раствор; (b) - ранение + ГМ-КСФ; (c) - ранение + ФНО- α ; (d) - ранение + ЭГ. (e) - длина раны при введении препаратов: 1 - буферный раствор; 2 - ГМ-КСФ; 3 - ФНО- α ; 4 - ЭГ. Значения представлены как $M \pm SEM$, $n=4$. * – различия между группой раненых животных и экспериментальной группой, которой вводили ЭГ, статистически значимы при $p < 0.05$.

При этом введении ГМ-КСФ не способствовало заживлению раны через 72 ч, а ФНО- α уменьшал длину раны (тенденция). ЭГ достоверно снижал длину раны и вызвал 100% смыкание краев раны (рис. 7).

Заключение

Поверхностное повреждение тела голотурии вызывает через 24 ч изменения фенотипа Ф1 и Ф2 фагоцитов, свидетельствующее в пользу активации Ф1 фагоцитов и супрессии Ф2 фагоцитов. Цитокины позвоночных, ГМ-КСФ и ФНО- α , способные индуцировать поляризацию макрофагов по M1 или M2 пути, при введении раненым голотуриям вызывают снижение уровня связывания растительного лектина con A в Ф1, но не Ф2, типе фагоцитов голотурии по сравнению с таковым при ранении, при этом ГМ-КСФ способствует также снижению связывания DBA в обоих типах фагоцитов, а ФНО- α – только в Ф1 фагоцитах. Такое изменение фенотипа свидетельствует о супрессии Ф1 фагоцитов, в то же время, по-видимому, повышающей их выживаемость. При этом только ФНО- α , который вызывал изменения фенотипа, свидетельствующие в пользу активации Ф2 фагоцитов, стимулировал заживление раны через 72 ч (тенденция). Экстракт из голотурий, который достоверно стимулировал заживление раны через 72 ч, не вызывал столь существенного супрессивного изменения фенотипа Ф1 фагоцитов, как цитокины, при этом способствовал также активации Ф2 фагоцитов. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования цитокинов для модуляции активности фагоцитов голотурий, а также о ранозаживляющей активности ЭГ, связанной, по-видимому, с его способностью поддерживать баланс между Ф1 и Ф2 фагоцитами, при котором Ф1 фагоциты в первые сутки после повреждения тканей остаются активными.

Литература

- Долматов И. Ю., Бобровская Н. В., Гирич А. С. Иглокожие как модельные объекты для изучения механизмов регенерации // Вестник СПбГУ. Сер. 3. 2014. Вып. 3. С. 96-112.
- Юшков Б.Г. Клетки иммунной системы и регуляция регенерации // Бюллетень сибирской медицины. 2017. Т. 16, № 4. С. 94-105.
- Wu J., Zhang L., Shi J. et al. Macrophage phenotypic switch orchestrates the inflammation and repair/regeneration following acute pancreatitis injury // EBioMedicine. 2020. P. 102920.
- Fraternal A., Brundu S., Magnani M. Polarization and repolarization of macrophages // J. Clin. Cell. Immunol. 2015. Vol. 6, № 2. P. 319.
- Ramírez-Gómez F., Aponte-Rivera F., Méndez-Castaner L., García-Ararrás J.E. Changes in holothurian coelomocyte populations following immune stimulation with different molecular patterns // Fish Shellfish Immunol. 2010. Vol. 29. P. 175-185.
- Долматова Л.С., Уланова О.А. Влияние экстракта из голотурий на скорость заживления раны поверхностного покрова и динамику концентрации цитокинов в модельном эксперименте // Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2014. № 3(57). С. 23-25.
- Dolmatova L.S., Ulanova O.A., Timchenko N.F. *Yersinia pseudotuberculosis* thermostable toxin dysregulates the functional activity of two types of phagocytes in the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // Biol. Bull. Russ. Acad. Sci. 2019. Vol. 46. P. 117-127.
- Dolmatova L.S., Elisaykina 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. Vol. 21. P. 293-304.
- McKenzie A.N.J., Preston T.M. Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by lectin staining and density centrifugation // Devel. Compar. Immunol. 1992. Vol. 16. P. 19-30.
- Seco-Rovira V., Beltran-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. Vol. 48. P. 974-983.
- Martins L., Gallo C. C., Honda T.S.B. et al. Skeletal muscle healing by M1-like macrophages produced by transient expression of exogenous GM-CSF // Stem Cell Research and Therapy. 2020. Vol. 11. Article number: 473.
- Krugluger W., Gessl A., Boltz-Nitulescu G., Förster O. Lectin binding of rat bone marrow cells during colony-stimulating factor type 1-induced differentiation: soybean agglutinin as a marker of mature rat macrophages // J. Leukoc. Biol. 1990. Vol. 48. P. 541-548.
- Dabritz J., Weinhage T., Varga G. et al. Reprogramming of monocytes by GM-CSF contributes to regulatory immune functions during Intestinal Inflammation // Journal of Immunology. 2015. Vol. 194.P. 2424-2438.