

УДК 57.084.1;616.995.121

<https://doi.org/10.31016/978-5-6046256-9-9.2022.23.490-496>

**ВЛИЯНИЕ СЕКРЕТОРНО-ЭКСКРЕТОРНЫХ
ПРОДУКТОВ ПЛЕРОЦЕРКОИДОВ ЛЕНТЕЦА ЧАЕЧНОГО
DIBOTHRIOCEPHALUS DENDRITICUS И ЛИГУЛЫ
LIGULA INTERRUPTA НА ВОСПАЛИТЕЛЬНУЮ
АКТИВАЦИЮ МАКРОФАГОВ**

Челомбитько М. А.¹,

кандидат биологических наук,
научный сотрудник отдела математических методов в биологии,
chelombitko@mail.bio.msu.ru

Павлюченкова А. Н.^{1,2},

научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов,
инженер 1-ой категории отдела молекулярной энергетики микроорганизмов,
anabella.gen@gmail.com

Кутырев И. А.²,

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов,
ikutyrev@yandex.ru

Мазур О. Е.²,

кандидат биологических наук, научный сотрудник
лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов,
olmaz33@yandex.ru

Дугаров Ж. Н.²,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов,
zhar-dug@biol.bsnet.ru

Аннотация

В данной работе впервые был исследован противовоспалительный потенциал секреторно-экскреторных продуктов (СЭП) плероцеркоидов лентеца чаечного *D. dendriticus* и лигулы *L. interrupta* в модели ЛПС-индуцированной

¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова (119992, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40)

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (670047, Россия, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д. 6)

активации макрофагов *in vitro*. В качестве модели макрофагов была использована клеточная линия моноцитов, полученная от пациента с острым моноцитарным лейкозом, ТНР-1. Клетки дифференцировали в макрофаги с помощью форболового эфира. Противовоспалительные свойства СЭП определяли по содержанию в инкубационной среде провоспалительных Th1-цитокинов ФНО и ИЛ-6, а также противовоспалительных Th2-цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 с помощью коммерческих наборов для иммуоферментного анализа. Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что инкубация макрофагов с СЭП от плероцеркоидов *L. interrupta* в концентрации 100 мкг/мл в течение ночи приводила к двукратному снижению содержания Th1-цитокинов ФНО и ИЛ-6 в среде культивирования в ходе ЛПС-индуцированной активации макрофагов. Предварительная инкубация макрофагов с СЭП от плероцеркоидов *D. dendriticus* в течение ночи не влияла на содержание в среде Th1-цитокинов ФНО и ИЛ-6. Таким образом, результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что СЭП от плероцеркоидов *L. interrupta* обладают выраженным противовоспалительным эффектом, в то время как СЭП от плероцеркоидов *D. dendriticus* таким эффектом не обладают. При этом механизм противовоспалительного действия СЭП от *L. interrupta* не выяснен и требует дальнейшего исследования.

Ключевые слова: лентец чаечный, *D. dendriticus*, лигула, *L. interrupta*, макрофаги

**THE EFFECT OF EXCRETORY/SECRETORY PRODUCTS
FROM *DIBOTHRIOCEPHALUS DENDRITICUS*
PLEROCERCIDS OF GULL TAPEWORM AND *LIGULA
INTERRUPTA* LIGULA ON INFLAMMATORY ACTIVATION
OF MACROPHAGES**

Chelombitko M. A. ¹,

Candidate of Biological Sciences, Researcher
of the Department of Mathematical Methods in Biology,
chelombitko@mail.bio.msu.ru

Pavlyuchenkova A. N. ^{1,2},

Researcher of the Laboratory of Parasitology and Ecology
of Aquatic Organisms, Engineer of the 1st Category of the Department
of Molecular Energetics of Microorganisms,
anabella.gen@gmail.com

¹ A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology of Lomonosov Moscow State University (1, Leninskiye Gory, Bldg. 40, Moscow, 119992, Russia)

² Institute of General and Experimental Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (6, Sakhyanovoi st., Ulan-Ude, 670047, Russia)

Kutyrev I. A.²,

Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher
of the Laboratory of Parasitology and Ecology of Aquatic Organisms,
ikutyrev@yandex.ru

Mazur O. E.²,

Candidate of Biological Sciences,
Researcher of the Laboratory of Parasitology and Ecology of Aquatic Organisms,
olmaz33@yandex.ru

Dugarov Zh. N.²,

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher
of the Laboratory of Parasitology and Ecology of Aquatic Organisms,
zhar-dug@biol.bsnet.ru

Abstract

In this paper, the anti-inflammatory potential of excretory/secretory products (ESP) from plerocercoids of *D. dendriticus* gull tapeworm and *L. interrupta* ligula was estimated for the first time in the model of LPS-induced activation of macrophages *in vitro*. A monocyte cell line derived from a patient with acute monocytic leukemia, THP-1, was used as a macrophage model. Cells were differentiated into macrophages using phorbol myristate acetate. The anti-inflammatory properties of ESP were determined by measurement of pro-inflammatory Th1-cytokines TNF and IL-6, as well as anti-inflammatory Th2-cytokines IL-4 and IL-10, in the incubation medium using commercial kits for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. The results of our study demonstrated that overnight incubation of macrophages with ESP from plerocercoids of *L. interrupta* at a concentration of 100 µg/ml led to a twofold decrease in the content of Th1-cytokines TNF and IL-6 in medium during LPS-induced activation of macrophages. Pre-treatment of macrophages with ESP from plerocercoids of *D. dendriticus* overnight did not affect the content of Th1-cytokines TNF and IL-6. The results of our study indicated that ESP from *L. interrupta* has a pronounced anti-inflammatory effect, while ESP from *D. dendriticus* does not have such an effect. At the same time, the mechanism of the anti-inflammatory action of ESP from *L. interrupta* has not been elucidated and requires further research.

Keywords: gull tapeworm, *D. dendriticus*, ligula, *L. interrupta*, macrophages

Введение. В последние два десятилетия усилился интерес к использованию иммунорегуляторных свойств секреторно-экскреторных продуктов (СЭП) гельминтов для терапии воспалительных и аллер-

²Institute of General and Experimental Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (6, Sakhyanovoi st., Ulan-Ude, 670047, Russia)

гических заболеваний [2, 5]. Имеются сведения о том, что паразиты и их СЭП могут оказывать противовоспалительный эффект, в частности, за счет влияния на макрофаги, клетки врождённого иммунитета, играющие ключевую роль в регуляции воспаления [1, 4]. Информации об иммунорегуляторах в классе Cestoda крайне мало [3]. В связи с этим в настоящей работе мы исследовали противовоспалительный потенциал СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* в модели ЛПС-индуцированной активации макрофагов *in vitro*.

Материалы и методы. Для получения СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* паразитов извлекали из полости тела хозяев, промывали в 0,65% физиологическом растворе для холоднокровных животных и помещали в раствор Хенкса, содержащим 10^5 МЕ/л пенициллина и 100 мг/л линкомицина, инкубировали 6 ч при 4 °С. Белковые фракции СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* получали путем объединения инкубационной среды и ее центрифугирования в концентрирующих колонках с диаметром пор 3 kDa. В полученных фракциях измеряли белок по Брэдфорд, далее образцы фильтровали через фильтры с размером пор 0,22 мкм. Оценка противовоспалительных свойств СЭП *D. dendriticus* и *L. interrupta* была проведена на клеточной линии моноцитов, полученной от пациента с острым моноцитарным лейкозом, ТНР-1. Клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% FBS и 2 mM глутамин при 37 °С и 5% CO₂. Для экспериментов клетки высевали на 96- и 12-луночные плашки в концентрации 500,000 клеток/мл и дифференцировали их в макрофаги путем инкубации с форболовым эфиром в концентрации 100 нМ в течение 48 часов. Для исследования цитотоксичности СЭП цестод использовали резазуриновый тест. Для исследования противовоспалительных свойств СЭП цестод клетки инкубировали с СЭП в течение ночи, далее добавляли 100 нг/мл ЛПС на 3 часа. В инкубационной среде измеряли содержание цитокинов ФНО и ИЛ-6, ИЛ-4 и ИЛ-10 с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа. Статистическая обработка данных и построение графиков проводились в программе GraphPad Prism 8.0. Для оценки статистической значимости отличий применяли тест множественных сравнений Даннета. Все данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($n \geq 3$).

Результаты исследований. Для того, чтобы оценить цитотоксический эффект СЭП плероцеркоидов на дифференцированные клетки ТНР-1 мы провели резазуриновый тест. Результаты этого анализа по-

казали, что инкубация клеток в течение 24 часов с СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* с содержанием белка в диапазоне от 1 до 100 мкг/мл не приводит к снижению жизнеспособности клеток (рис. 1).

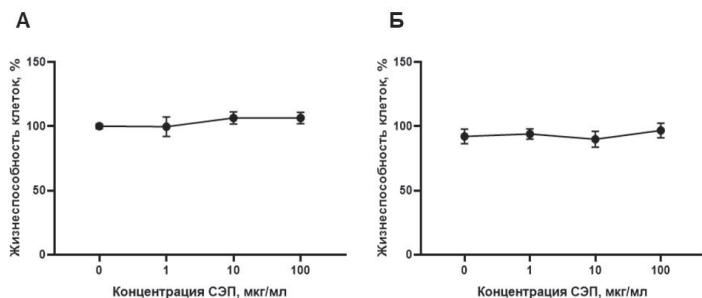


Рис. 1. Влияние СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* (А) и *L. interrupta* (Б) на жизнеспособность дифференцированных клеток ТНР-1

Для оценки противовоспалительного эффекта СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* на ЛПС-индуцированную активацию макрофагов определяли концентрации Th1-цитокинов ФНО и ИЛ-6, а также Th2-цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 в среде культивирования. Анализ результатов данного исследования показал, что предварительная инкубация макрофагов с СЭП от плероцеркоидов *D. dendriticus* в течение ночи не влияет на содержание в среде Th1-цитокинов ФНО и ИЛ-6 ни в одной из исследуемых концентраций, что свидетельствует об отсутствии эффекта на ЛПС-индуцированную активацию (рис. 2). В то же время, предварительная инкубация дифференцированных клеток ТНР-1 с СЭП от плероцеркоидов *L. interrupta* в концентрации 100 мкг/мл в течение ночи приводила к двукратному снижению содержанию Th1-цитокинов ФНО и ИЛ-6 в среде культивирования в ходе ЛПС-индуцированной активации клеток, что свидетельствует о противовоспалительном эффекте (рис. 2). Стоит отметить, что концентрация Th2-цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-10 в среде культивирования не превышала 20 пг/мл и не менялась под воздействием СЭП обоих видов цестод и ЛПС (данные не представлены).

Заключение. Полученные результаты, в целом, свидетельствуют о том, что СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* обладает выраженным противовоспалительным эффектом в модели ЛПС-индуцированной

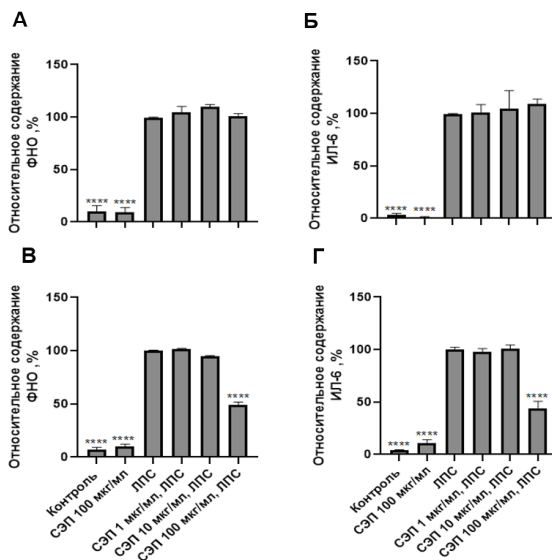


Рис. 2. Влияние СЭП от плероцеркоидов *D. dendriticus* (А, Б) и *L. interrupta* (В, Г) на ЛПС-индуцированную воспалительную активацию дифференцированных клеток ТНР-1.

(А, В) Относительное содержание цитокина ФНО в инкубационной среде.

(Б, Г) Относительное содержание цитокина ИЛ-6 в инкубационной среде.

**** $p \leq 0,0001$ по сравнению с ЛПС

активации макрофагов ТНР-1, в то время как СЭП от плероцеркоидов *D. dendriticus* таким эффектом не обладает. При этом механизм противовоспалительного действия СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* не выяснен и требует дальнейшего исследования.

Авторы выражают благодарность Елизову А. В., Селиванову А. В., Попову А. Г., Никонову Д. П. (Байкальский специализированный участок по борьбе с болезнями рыб и других гидробионтов, Республика Бурятия), Жепхоловой О. Б. (ИОЭБ СО РАН) за помощь в сборе материала. Оценка противовоспалительных свойств секреторно-экскреторных продуктов цестод в модели ЛПС-индуцированной активации макрофагов ТНР-1 была проведена в ИОЭБ СО РАН при финансовой поддержке РФФ (грант 22-24-00341); поиск и анализ литературных источников, консультации по методике выполнения работ, анализ полученных результатов и написание статьи было проведено в НИИ ФХБ МГУ.

Список источников / References

1. Bai X., Wu X., Wang X., et al. Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* *in vitro*. *Mol Cell Biochem*. 2012; 360: 79-88.
2. Harnett W. Secretory products of helminth parasites as immunomodulators. *Mol Biochem Parasitol*. 2014; 195(2): 130-136.
3. Kutyrev I. A., Biserova N. M., Olennikov D. N., Korneva J. V., Mazur O. E. Prostaglandins E₂ and D₂-regulators of host immunity in the model parasite *Dipyllobothrium dendriticum*: An immunocytochemical and biochemical study. *Mol Biochem Parasitol*. 2017; 212: 33-45.
4. Wang Z., Hao C., Zhuang Q., et al. Excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* adult worms attenuated DSS-induced colitis in mice by driving PD-1-mediated M2 macrophage polarization. *Front. Immunol*. 2020; 11: 563784.
5. Wu Z., Wang L., Tang Y., Sun X. Parasite-derived proteins for the treatment of allergies and autoimmune diseases. *Front. Microbiol*. 2017; 8: 2164.