

УДК 615.32:593.96

Исследование иммуномодулирующих свойств экстракта из дальневосточных видов голотурий при заживлении ран на модели голотурии *Eupentacta fraudatrix*

Л.С. Долматова¹, И.Ю. Долматов²

¹ Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН (ФГБУН «ТОИ ДВО РАН»), г. Владивосток

² Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского, Национальный научный центр морской биологии (ФГБУН «ИБМ НИЦМБ ДВО РАН»), г. Владивосток; Дальневосточный федеральный университет (ФГАОУ ВПО «ДФУ»), г. Владивосток
E-mail: dolmatova@poi.dvo.ru

При экспериментальном моделировании повреждения поверхностного покрова (резаная рана) голотурии *Eupentacta fraudatrix* установлены снижение количества циркулирующих целомоцитов и их жизнеспособности через 2 и 4 суток после повреждения стенки тела по сравнению с контролем (инъекция буфера). В эти же периоды происходили противоположные изменения в уровнях связывания растительных лектинов поверхностными рецепторами двух типов фагоцитов голотурии (Ф1 и Ф2), а также в уровне апоптоза в этих клетках. Установленные различия в функциональных и фенотипических характеристиках двух типов фагоцитов в различные сроки после повреждения указывают на различную роль этих фагоцитов на отдельных этапах заживления раны. Новый экстракт из дальневосточных видов голотурий (ЭГ) вызывал еще большее снижение количества целомоцитов в целомической жидкости, повышал жизнеспособность целомоцитов, способствовал стимуляции функциональной активности преимущественно фагоцитов второго типа и увеличивал выраженность фенотипических изменений Ф1 фагоцитов по сравнению с таковой при повреждении тканей в отсутствие ЭГ. Полученные данные свидетельствуют о важном значении иммуномодулирующих свойств ЭГ для реализации его ранозаживляющего эффекта.

Ключевые слова: апоптоз, конканавалин А, лектин из *Dolichos biflorus*, репарация тканей, фагоциты.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов заживления ран и поиск новых препаратов для их лечения имеют важное значение как для биологии и медицины, так и для развития технологий марикультуры, поскольку повреждение наружных покровов часто наблюдается у выращиваемых гидробионтов и может приводить к их гибели [Гаевская, 2004].

Ранее было показано, что новый экстракт из тканей дальневосточных видов голотурий (ЭГ) [Долматова, Долматов, 2002], обладающий иммуномодулирующими свойствами [Долматова и др., 2012], значительно ускоряет заживление поверхностных ран у голотурий [Долматова, Уланова, 2014]. Представляло интерес выяснение возможных иммуномодулирующих механизмов влияния экстракта на заживление ран.

Система врожденного иммунитета, находящаяся на первой линии защиты от неблагоприятных внешних факторов, инициирует процесс воспаления, проходящий через стадии инициации, собственно воспаления, разрешения и восстановления целостности тканей [Italiani, Boraschi, 2014]. У позвоночных мононуклеары играют важную роль при воспалении удаляя инфекционный агент и организуя каждую фазу воспалительного процесса [Van Furth, Cohn, 1968]. При этом разные субпопуляции макрофагов/моноцитов вовлечены на разных стадиях воспаления и репарации [Wang et al., 2014]. Так, M1-макрофаги представляют первую линию защиты от инфекционных патогенов, для них характерен высокий уровень продукции активных форм кислорода, а M2-макрофаги продуцируют факторы роста и ферменты, необходимые для ремоделирования экстраклеточного матрикса, очищают ткани от отмерших клеток, тем самым участвуя в заживлении ран. Мобилизация в ткани макрофагов и их поляризация в соответствии с фазой заживления имеют критическое значение для успешного заживления ран у позвоночных. В настоящее время одним из перспективных подходов в терапии различных состояний считается модуляция соотношения макрофагов двух типов [Лямина, Малышев, 2014], ведется поиск веществ, действие которых осуществляется по этому механизму.

У иглокожих также описано участие фагоцитов в заживлении ран [Hernroth et al., 2010; Долматова, Уланова, 2014], кроме того, у некоторых видов, в том числе, голотурии *Eupentacta fraudatrix* (D'yakonov & Varanova in D'yakonov et al., 1958) [Chia, Xing, 1996; Долматова и др., 2004] фагоциты методом градиентного центрифугирования были разделены на две и более фракций. Однако участие отдельных субпопуляций в процессе заживления ран не было исследовано.

Способность голотурий в течение жизни сохранять способность к регенерации частей тела и простота строения делают их перспективной моделью для изучения механизмов репарации [Долматов, Машанов, 2007]. Эволюционная близость голотурий, как Deuterostomata, к позвоночным и наличие некоторых эволюци-

онно консервативных элементов иммунитета [Жокряков, 2006] предполагает возможность изучения на этой модели иммунных механизмов заживления ран.

Целью работы явилось выяснение влияния ЭГ на количественные показатели клеток целомической полости, а также на фенотипические и функциональные маркеры двух субпопуляций фагоцитов *E. fraudatrix* в процессе заживления раны.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Объектом исследования были голотурии *E. fraudatrix* с длиной тела 4–5,5 см, собранные в марте на станции «Восток» Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (зал. Восток Японского моря) с использованием легководолазного снаряжения. До начала экспериментов животные находились в аквариумах с проточной аэрируемой морской водой с соответствующей сезону температурой не менее двух недель.

Экстракт из голотурий получали по методу, описанному ранее [Долматова, Долматов, 2002].

Поверхностный надрез стенки тела производили скальпелем без повреждения эпителиальной выстилки целомической полости. В другом участке тела голотурии в целомическую полость вводили фосфатно-солевой буфер (рН 7,6) с добавлением 36 г/л NaCl (ФСБ) или раствор ЭГ в ФСБ (0,3 мкг/г). Контрольным животным делали укол с ФСБ, не производя надрез. Целомическую жидкость отбирали сразу после надреза и через 2 и 4 суток. Каждая группа животных состояла из трёх-четырёх особей.

Полученную целомическую жидкость добавляли к равному объёму антикоагулирующего раствора [Chia, Xing, 1996]. Разделение фагоцитов двух субпопуляций проводили в ступенчатом градиенте фиколл-верографина, как описано ранее [Долматова и др., 2004]. Концентрацию клеток в целомической жидкости считали в камере Горяева. Жизнеспособность клеток определяли методом исключения трипанового синего.

Определение уровня связывания поверхностных рецепторов клеток с ФИГЦ (флюоросцеин изотиоцианат) — конъюгированным

конканавалином А (кон А) или лектином из луковиц гиацинта *Dolichos biflorus* (ДВА) проводили по методу, описанному McKenzie и Preston [McKenzie, Preston, 1992]. Детекцию ярко-зелёной флуоресценции клеток проводили на флюоресцентном микроскопе Leica DM 4500 (Германия).

Конденсацию хроматина определяли окрашенной Hoechst 33342 [Komatsu, Oda, 1998] с последующим исследованием ярко-голубой флуоресценции на микроскопе Leica DM 4500.

Результаты обрабатывали статистически. Данные представлены в виде $M \pm m$. Для определения достоверности различий между группами использовали t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что клеточные элементы целомической жидкости (целоמוциты) иглокожих играют важную роль в заживлении раны [Boooloatip, Guise, 1959; Кудрявцев и др., 2004]. В норме фагоциты составляют до 40% от общего числа целоמוцитов голотурий [Елисейкина, Магарламов, 2002] и могут быть основными клетками в целомической жидкости при регенерации [Магарламов, 2004]. Для выяснения участия фагоцитов голотурии *E. fraudatrix* в заживлении раны в исследуемые сроки эксперимента нами предварительно была измерена концентрация целоמוцитов в целоми-

ческой жидкости (рис. 1 А). Было показано, что у контрольных животных, которым было произведено повреждение целомической полости (укол), происходил рост количества целоמוцитов с увеличением времени наблюдения, что соответствует данным, полученным при повреждении целомической полости у другого вида голотурий [Магарламов, 2004]. При этом у опытных животных, которым кроме укола был произведен надрез стенки тела, концентрация циркулирующих целомоцитов в оба исследованных интервала времени снижалась примерно в равной степени: в 1,9 раза через 2 суток и в 2,1 раза через 4 суток по сравнению с контролем (укол). Такое значительное снижение содержания целомоцитов отмечено ранее и для представителей других классов иглокожих и, по-видимому, связано с рекрутированием целомоцитов к месту повреждения [Кудрявцев и др., 2004]. При этом ЭГ не оказывал влияния на этот процесс через 2 суток, но стимулировал еще большее снижение через 4 суток (на 35%). В предыдущих исследованиях нами было показано, что ранозаживляющий эффект экстракта увеличивается с возрастанием срока после повреждения и к 5 суткам ЭГ ускорила заживление на 37% [Долматова, Уланова, 2014]. По-видимому, эффект экстракта связан с его способностью стимулировать рекрутирование целомоцитов.

В то же время происходило снижение жизнеспособности целомоцитов (рис. 1 Б). В первые 2 суток жизнеспособность практически не

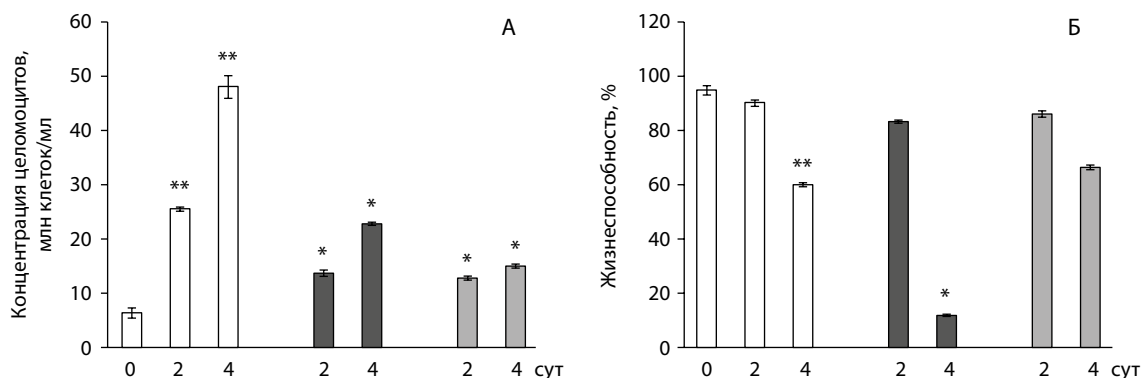


Рис. 1. Динамика концентрации циркулирующих целомоцитов *E. fraudatrix* (А) и их жизнеспособности (Б) после поверхностного надреза стенки тела. Белые столбики-контроль (укол с введением ФСБ), черные — надрез + укол, введение ФСБ, серые — надрез + укол, введение экстракта из голотурий.

* $P < 0,05$ по сравнению с исходным контролем (для белых столбиков). ** $P < 0,05$ по сравнению с контролем (для окрашенных столбиков)

изменялась по сравнению с контролем, а через 4 суток снижалась в 5 раз. Снижение жизнеспособности может быть связано с повышением функциональной активности фагоцитов, продуцирующих активные формы кислорода (АФК), которые токсичны для самих фагоцитов. Рост продукции АФК на фоне снижения количества клеток и их жизнеспособности отмечен ранее у морских звёзд при повреждении их покровов [Кудрявцев и др., 2004]. При этом ЭГ не влиял на жизнеспособность через 2 суток, но возвращал её через 4 суток к уровню контроля.

Фагоциты голотурии *E. fraudatrix* представлены Ф1 и Ф2 типами, обладающими разным уровнем фонового апоптоза [Dolmatova, Ulanova, 2015]. С целью проверки вклада каждого из этих типов клеток в снижение жизнеспособности целомоцитов было проведено измерение уровня фрагментации ДНК в этих клетках (табл. 1).

Через 2 суток от повреждения в Ф1 фагоцитах не происходило достоверных изменений в уровне фрагментации ДНК, которая является морфологическим маркером апоптоза [Komatsu, Oda, 1998], а через 4 суток происходило её снижение в 1,6 раза. В Ф2 фагоцитах через 2 суток, напротив, фрагментация ДНК возрастала в 2 раза, и через 4 суток она оставалась на таком же уровне. Отсутствие достоверных изменений жизнеспособности целомоцитов в первые 2 суток, несмотря на рост апоптоза в Ф2-типе фагоцитов, может быть связано с меньшей долей последних в общем числе целомоцитов по сравнению с долей Ф1 фагоцитов, уровень апоптоза которых не менялся. И, напротив, значительное снижение

жизнеспособности целомоцитов при росте апоптоза только в Ф2 фагоцитах через 4 суток может быть связано с большей долей этих клеток в общем пуле фагоцитов.

Необходимо отметить, что динамика уровня фрагментации ДНК в Ф1 и Ф2 фагоцитах носила противоположный характер. Это может свидетельствовать о различной роли Ф1 и Ф2 в репарации раны. Высокий уровень апоптоза, отмеченный в Ф1, и низкий — в Ф2 фагоцитах через 2 суток после повреждения, по-видимому, обусловлены преимущественной активацией Ф1 типа фагоцитов в этот период заживления раны, а через 4 суток наблюдается уже обратное соотношение.

У позвоночных первые 4 суток после ранения относят к ранней провоспалительной стадии, на которой основную роль играет М1 тип макрофагов, а после 4 суток начинается стадия репарации, на которой основную роль играет М2 тип [Italiani, Boraschi, 2014; Wang et al., 2014]. Противоположная направленность функциональной активности фагоцитов голотурии Ф1 и Ф2 типов и, по-видимому, динамики их концентраций в целомической жидкости может быть также связана с их различной ролью на отдельных стадиях заживления раны.

При этом в Ф1 фагоцитах через 2 суток ЭГ снижал уровень апоптоза на 63%, а в Ф2 — не оказывал влияния по сравнению с контролем. Через 4 суток ЭГ предотвращал изменения апоптоза в Ф1 фагоцитах. Таким образом, ЭГ сдвигал соотношение активностей Ф1 и Ф2 фагоцитов в сторону последней уже через 2 суток, с чем может быть связано индуцированное им ускорение заживления раны, показанное ранее [Долматова, Уланова, 2014].

Таблица 1. Доля (%) Ф1 и Ф2 фагоцитов с фрагментированной ДНК после повреждения стенки тела голотурии *E. fraudatrix*

Тип фагоцитов	Экспериментальное воздействие					
	контроль (укол с введением ФСБ)		надрез + укол с введением ФСБ		надрез + укол с введением ЭГ	
	2 сут	4 сут	2 сут	4 сут	2 сут	4 сут
Ф1	36,0±4,1	25,3±2,4	40,7±2,7	15,7±2,4*	15,2±1,2*	22,5±1,8
Ф2	13,5±1,5	13,8±1,6	28,6±2,7*	25,6±3,1*	28,4±2,9*	-

Примечание: здесь и далее * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

На нормальных голотуриях было показано, что ЭГ модулирует синтез цитокиноподобных веществ в Ф1 и Ф2 фагоцитах противоположным образом [Долматова и др., 2014]. Можно предположить, что у животных с повреждением покровов ЭГ мог влиять на рекрутирование целомоцитов и снижение апоптоза в обоих типах фагоцитов за счет модуляции синтеза провоспалительных цитокиноподобных веществ.

Растительные лектины часто используются для фенотипирования животных клеток [Seco-Rovira et al., 2012]. Кон А — лектин из *Canavalia ensiformis*, связывается преимущественно с остатками маннозы/глюкозы поверхностных рецепторов клеток [Гнедкова и др., 2015]. У голотурий Ф1 фагоциты связывают его в значительном количестве, как показано в табл. 2. Известно, что у позвоночных этот лектин может связываться преимущественно с апоптотическими клетками [Seco-Rovira et al., 2012]. Высокий уровень его связывания в контрольных Ф1 фагоцитах соответствует высокому уровню их апоптоза, продемонстрированному выше. Ранение животного приводило к значительному снижению уровня связывания кон А в Ф1 фагоцитах, в 3 раза через 2 суток и в 4,7 раза через 4 суток. При этом снижение уровня связывания этого лектина, особенно выраженное через 4 суток, соответствует снижению уровня апоптоза в этих клетках.

Напротив, уровень связывания ДВА, специфичного к остаткам N-ацетилгалактозамина [Гнедкова и др., 2015], в Ф1 фагоцитах возрастал в 3 раза, а через 4 суток возвращался к уровню контроля. Таким образом, изменения связывания кон А и ДВА были независимы и, по-видимому, связаны с разными механизмами клеточного сигналинга.

Введение ЭГ через 2 суток снижало связывание кон А фагоцитами Ф1 в 5 раз по сравнению с контролем, а через 4 суток практически подавляло его. Такое действие ЭГ соответствует снижению апоптоза в Ф1 фагоцитах, как показано выше. ЭГ, однако, стимулировал связывание ДВА через 4 суток в 4 раза по сравнению с контролем до уровня, сопоставимого с таковым через 2 суток после ранения. Имеющиеся данные об увеличении выживаемости клеток при стимуляции рецепторов, содержащих остатки галактозидов [Kim et al., 2014], дают возможность предполагать, что такая стимуляция в Ф1 фагоцитах, индуцированная ЭГ, способствовала выживаемости целомоцитов голотурий.

В контрольных Ф2 фагоцитах через 4 суток уровень связывания кон А был в 4 раза меньше, чем в Ф1, а ранение привело к его росту на 24% (табл. 3). Сопоставление этих изменений с динамикой апоптоза в Ф2 фагоцитах подтверждает наличие прямой связи между уровнем связывания кон А клетками и интенсивностью апоптоза.

Таблица 3. Связывание ФИТЦ-меченых растительных лектинов с поверхностными рецепторами Ф2 — субпопуляции фагоцитов голотурии *E. fraudatrix* через 4 сут после повреждения стенки тела

Лектин	Экспериментальное воздействие	
	контроль (укол с введением ФСБ)	надрез + укол с введением ФСБ
Кон А	18,1±1,1	24,0±1,9
ДВА	22,3±2,6	31,0±2,7*

Уровень связывания ДВА в Ф2 фагоцитах через 4 суток возрастал на 39%, что также может отражать участие галактозид-содержа-

Таблица 2. Динамика связывания ФИТЦ-меченых растительных лектинов с поверхностными рецепторами Ф1 — субпопуляции фагоцитов голотурии *E. fraudatrix* после повреждения стенки тела

Лектин	Экспериментальное воздействие					
	контроль (укол с введением ФСБ)		надрез + укол с введением ФСБ		Надрез + укол с введением ЭГ	
	2 сут	4 сут	2 сут	4 сут	2 сут	4 сут
Кон А	60,1±8,4	75,0±4,3	19,1±2,5	16,2±1,8*	11,9±1,1*	5,1±0,3*
ДВА	15,5±0,9	13,0±1,0	46,7±3,8	20,2±2,5	-	41,0±3,5*

щихрецепторов на поверхности Ф2-типа фагоцитов в стимуляции противовоспалительных механизмов на стадии перехода к репарации. Эти данные свидетельствуют о противоположной направленности изменений не только функциональной активности, но и фенотипа Ф1 и Ф2 фагоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поверхностный надрез стенки целомоцитов голотурий вызывает снижение концентрации циркулирующих целомоцитов, по-видимому, за счёт их рекрутирования из целомической полости в ткани, окружающие рану, а также снижение их жизнеспособности, обусловленное апоптозом фагоцитов. Изменения уровня апоптоза и связывания растительных лектинов кон А и ДВА имели противоположную направленность в Ф1 и Ф2 фагоцитах, что, по-видимому, отражает различную роль Ф1 и Ф2 фагоцитов на отдельных этапах заживления раны. ЭГ стимулировал рекрутирование целомоцитов и повышал их жизнеспособность, модулируя апоптоз и экспрессию поверхностных рецепторов двух типов фагоцитов и вызывая сдвиг в активности этих клеток преимущественно в сторону преобладания активности Ф2 типа. Это свидетельствует о важном вкладе иммуномодулирующих свойств ЭГ в его ранозаживляющем действии.

Необходимо также отметить, что установление маркеров функциональных и фенотипических различий Ф1 и Ф2 фагоцитов позволяет выявить динамику их активности на определённом этапе заживления раны, открывая возможность моделирования макрофагозависимых механизмов заживления тканей *in vivo*, являющихся наименее изученными, на более простой модели фагоцитов голотурий.

ЛИТЕРАТУРА

- Гаевская А.В. 2004. Паразиты и болезни морских и океанических рыб в природных и искусственных условиях. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 237 с.
- 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. 2015. Лектинсвязывающие и туморогенные свойства клеток глиомы С6 // Онкология. Т. 17. № 1. С. 4–11.
- Долматов И.Ю., Машанов В.С. 2007. Регенерация у голотурий. Владивосток: Дальнаука. 208 с.
- Долматова Л.С., Долматов И.Ю. 2002. Композиция для лечения и профилактики кожных заболеваний и ран у человека и животных: Патент 2183962 РФ. Б. И. № 18. С. 160.
- Долматова Л.С., Елисейкина М.Г., Ромашина В.В. 2004. Антиоксидантная ферментативная активность целомоцитов дальневосточной голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. Т. 40. № 2. С. 104–111.
- Долматова Л.С., Заика О.А., Тимченко Н.Ф. 2012. Влияние экстракта из дальневосточных видов голотурий на оксидантно-антиоксидантный баланс и апоптоз в макрофагах мышей при экспериментальной псевдотуберкулезной инфекции // Тихоокеанский медицинский журнал. № 1 (47). С. 53–56.
- Долматова Л.С., Уланова О.А. 2014. Влияние экстракта из голотурий на скорость заживления раны поверхностного покрова и динамику концентрации целомоцитов в модельном эксперименте // Здоровье. Медицинская экология. Наука. № 3 (57). С. 23–25.
- Долматова Л.С., Уланова О.А., Долматов И.Ю. 2014. Сравнительное исследование действия дексаметазона и нового экстракта из голотурий на уровень цитокиноподобных веществ в отдельных типах иммуноцитов голотурии *Eupentacta fraudatrix* // Тихоокеанский медицинский журнал. № 1. С. 13–17.
- Елисейкина М.Г., Магарламов Т.Ю. 2002. Морфология целомоцитов голотурий *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) и *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae) // Биология моря. Т. 28. № 3. С. 214–219.
- Кокряков В.Н. 2006. Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука. 261 с.
- Кудрявцев И.В., Злобина М.В., Баскаков А.В., Галактионов Н.К., Канайкин Д.П., Козлова А.Б., Харазова А.Д., Полещиков А.В. 2004. Анализ механизмов врожденного иммунитета морской звезды *Asterias rubens* // Вестник Санкт-Петербургского университета. Сер. 3. Вып. 4. С. 69–75.
- Лямина С.В., Малышев И.Ю. 2014. Поляризация макрофагов в современной концепции формирования иммунного ответа // Фундаментальные исследования. № 10 (5). С. 930–935.
- Магарламов Т.Ю. 2004. Целомоциты иглокожих и их роль в защитных реакциях Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Владивосток: ИБМ ДВО РАН. 26 с.
- Booolootain R.A., Guise A.C. 1959. Clotting of echinoderm coelomic fluid // J. Exp. Zool. V. 140. P. 207–229.
- Chia F., Xing J. 1996. Echinoderm coelomocytes // Zoological Studies. V. 35. P. 231–254.

- Dolmatova L.S., Ulanova O.A.* 2015. Dexamethasone treatment in vitro resulted in different responses of two fractions of phagocytes of the holothurian *Eupentacta fraudatrix* // Russian J. Mar. Biol. V. 41. № 6. P. 503–506.
- Italiani P., Boraschi D.* 2014. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation // Frontiers in immunology. V. 5. P. 514.
- Hernroth B., Farahani F., Brunborg G., Dupont S., Dejmeck A., Sköld H.N.* 2010. Possibility of mixed progenitor cells in sea star arm regeneration // J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. V. 314. № 6. P. 457–468.
- Kim S-M., Fujihara M., Sahare M., Minami N., Yamada M., Imai H.* 2014. Effects of extracellular matrices and lectin *Dolichos biflorus* agglutinin on cell adhesion and self-renewal of bovine gonocytes cultured in vitro // Reprod. Fertil. Dev. V. 26. № 2. P. 268–281.
- Komatsu N., Oda T., Muramatsu T.* 1998. Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and *Pseudomonas* toxin // J. Biochem. V. 124. P. 1038–1044.
- McKenzie A.N.J., Preston T.M.* 1992. Functional studies on *Calliphora vomitoria* haemocyte subpopulations defined by lectin staining and density centrifugation // Develop. Comp. Immunology. V. 16. № 1. P. 19–30.
- Seco-Rovira V., Beltrán-Frutos E., Ferrer C., Sánchez-Huertas M.M., Madrid J.F., Saez F.J., Pastor L.M.* 2013. 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. V. 48. № 6. P. 974–983.
- Van Furth R., Cohn Z.A.* 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes // J. Exp. Med. V. 128. P. 415–435.
- Wang N., Liang H., Zen K.* 2014. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance // Front. Immunol. V. 5. P. 614.
- Dolmatov I.YU., Mashanov V.S.* 2007. Regeneraciya u goloturij [Regeneration in holothurians]. Vladivostok: Dal'nauka. 208 s.
- Dolmatova L.S., Dolmatov I. Yu.* 2002. Kompoziciya dlya lecheniya i profilaktiki kozhnyh zabolevanij i ran u cheloveka i zhivotnyh [Composition to treat and prevent human and animal skin diseases and wounds]. Patent 2183962 RF. B. I. № 18. S. 160.
- Dolmatova L.S., Elisejkina M.G., Romashina V.V.* 2004. Antioksidantnaya fermentativnaya aktivnost' celomocitov dal'nevostochnoj goloturii *Eupentacta fraudatrix* [Activity of antioxidant enzymes in coelomocytes of *Eupentacta fraudatrix*] // Zhurnal ehvolucionnoj biologii i fiziologii. T. 40. № 2. S. 104–111.
- Dolmatova L.S., Ulanova O.A., Dolmatov I. Yu.* 2014. Sravnitel'noe issledovanie dejstviya deksametazona i novogo ehkstrakta iz goloturij na uroven' citokinopodobnyh veshchestv v ot del'nyh tipah immunocitov goloturii *Eupentacta fraudatrix* [Comparative study of the effect of dexamethasone and new holothurian's extract on the level of the cytokine similar substances in certain immune cells types in the holothurian *Eupentacta fraudatrix*] // Tihookeanskij medicinskij zhurnal. № 1. S. 13–17.
- Dolmatova L.S., Ulanova O.A.* 2014. Vliyanie ehkstrakta iz goloturij na skorost' zazhivleniya rany poverhnostnogo pokrova i dinamiku koncentracii celomocitov v model'nom ehksperimente [The effects of holothurian extract on rate of healing the body cover wound and dynamics of coelomocyte concentration in model experiment] // Zdorov'e. Medicinskaya ehkologiya. Nauka. № 3 (57). S. 23–25.
- Dolmatova L.S., Zaika O.A., Timchenko N.F.* 2012. Vliyanie ehkstrakta iz dal'nevostochnykh vidov goloturij na oksidantno-antioksidantnyj balans i apoptoz v makrofagah myshej pri ehksperimental'noj psevdotuberkuleznoj infekcii [Effects of the extract from far-eastern holothurians on the oxidant-antioxidant balance and apoptosis in mice macrophages under the experimental pseudotuberculosis infection] // Tihookeanskij medicinskij zhurnal. № 1 (47). S. 53–56.
- Elisejkina M.G., Magarlamov T. Yu.* 2002. Morfologiya celomocitov goloturij *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) i *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae) [Morphology of coelomocytes of holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae)] // Biologiya morya. T. 28. № 3. S. 214–219.
- Kokryakov V.N.* 2006. Oчерki o vrozhdennom immunitete [Essays on innate immunity]. SPb.: Nauka. 261 c.

REFERENCES

- Gaevskaya A.V.* 2004. Parazity i bolezni morskikh i okeanicheskikh ryb v prirodnyh i iskusstvennyh usloviyah [Parasites and diseases of marine and oceanic fishes in natural and culture conditions]. Sevastopol': EHKOSI-Gidrofizika. 237 s.
- Gnedkova I.A., Lisyanyj N.I., Staneckaya D.N., Rozumenko V.D., Glavackij A.YA., SHmeleva A.A., Malysheva T.A., Chernenko O.G., Gnedkova M.A.* 2015. Lektinsvyazyvayushchie i tumorogennye svojstva kletok gliomy S6 [Lectin-binding and tumorigenic properties of glioma C6 cells] // Onkologiya. T. 17. № 1. S. 4–11.

- Kudryavcev I.V., Zlobina M.V., Baskakov A.V., Galaktionov N.K., Kanajkin D.P., Kozlova A.B., Harazova A.D., Polevshchikov A.V.* 2004. Analiz mekhanizmov vrozhdenного immuniteta morskoy zvezdy *Asterias rubens* [Innate immunity mechanisms of sea star *Asterias rubens*] // Vestnik Sankt-Peterburgskogo universiteta. Ser. 3. Vyp.4. S. 69–75.
- Lyamina S.V., Malyshev I. Yu.* 2014. Polyarizatsiya makrofagov v sovremennoy koncepcii formirovaniya immunnogo otveta [Macrophage polarization in the modern concept of immune response development] // Fundamental'nye issledovaniya. № 10 (5). S. 930–935.
- Magarlamov T. Yu.* 2004. Celomocytity iglokozhih i ih rol' v zashchitnyh reakciyah [Coelomocytes of echinoderms in protective responses]. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. Vladivostok: IBM DVO RAN. 26 s.

Поступила в редакцию 21.03.2017 г.
Принята после рецензии 06.04.2017 г.

Studies on the immunomodulating activity of the extract of the far eastern species of sea cucumbers during wound healing modelled on the holothurian *Eupentacta fraudatrix*

L.S. Dolmatova¹, I. Yu. Dolmatov²

¹ V.I. Il'ichev Pacific Oceanological Institute (FSBSI «POI FEB RAS»), Vladivostok

² A.V. Zhirmunsky Institute of Marine Biology, National Scientific Center of Marine Biology, (FSBSI «NSCMB» FEB RAS) Vladivostok; Far Eastern Federal University, (FSBEI HPE «FEFU»), Vladivostok

Experimental modelling the superficial damage (slash wound) of a sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* body wall revealed the reduced quantity of the circulating coelomocytes and decrease in their viability compared to the control (phosphate-buffered saline injection). At the same time, the opposite variations in the levels of plant lectins binding to the surface receptors of the two types of phagocytes (P1 and P2) as well as in apoptosis levels were detected. These differences in functional and phenotypic features of the two types of phagocytes indicate the different roles of P1 and P2 phagocytes in the distinct stages of wound healing. A novel extract of the the far eastern species of sea cucumbers induced the more significant reduction in the coelomocyte number in coelomic fluid, elevated cell viability, facilitated the increase in functional activity of P2 phagocytes mainly, and increased the phenotypic changes in P1 phagocytes during wound healing compared to those in the absence of the extract. The data obtained indicate that the immunomodulating properties of the extract make significant contribution to its mechanisms to heal wounds.

Key words: apoptosis, concanavalin A, *Dolichos biflorus* agglutinin, tissue reparation, phagocytes.