

УДК [616.98:579.842.23-06:616.94]-085.324:563.96

## ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ВИДОВ ГОЛОТУРИЙ НА ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЙ БАЛАНС И АПОПТОЗ В МАКРОФАГАХ МЫШЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Л.С. Долматова<sup>1</sup>, О.А. Заика<sup>1</sup>, Н.Ф. Тимченко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Балтийская, 43),

<sup>2</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1)

**Ключевые слова:** иерсинии, экстракт из голотурий, макрофаги, сепсис.

Исследовано влияние экстракта из дальневосточных видов голотурий на уровень продукции нитросинего тетразолия и активность антиоксидантных ферментов макрофагов мышей, зараженных *Yersinia pseudotuberculosis*. Установлено, что при 100 %-ной выживаемости у 67 % инфицированных животных происходила коагуляция перитонеальной жидкости. Трехсуточное введение инфицированным животным ЭГ в концентрациях 0,5–1 мг/кг подавляло функциональную активность макрофагов и оказывало защитный антисептический эффект, снижая число мышей с септическими проявлениями инфекции. В дозе 10 мг/кг экстракт стимулировал функциональную активность макрофагов, но и увеличивал количество мышей с коагуляцией перитонеальной жидкости. Авторы предлагают использование экстракта из голотурий в низких дозах для комплексного лечения септических проявлений при иерсиниозе.

Псевдотуберкулез, вызываемый *Yersinia pseudotuberculosis* (дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка), постоянно регистрируется в России и за рубежом. Заболевание характеризуется клиническим полиморфизмом и нередкой генерализацией инфекции [6]. Лечение псевдотуберкулеза часто осложняется формированием лекарственно-резистентных штаммов возбудителя. Все это обуславливает необходимость совершенствования фармакотерапии заболевания, разработок и исследований новых препаратов, в том числе иммуномодулирующей направленности, поскольку возбудитель псевдотуберкулеза вызывает значительные повреждения иммунитета [14].

Из тканей ряда дальневосточных голотурий (*Cusimaria japonica*, *Eupentacta fraudatrix*) получен экстракт, содержащий комплекс биологически активных веществ и получивший коммерческое название «Пентакан» (ТУ 9154-001-77418193). Первоначально обнаружена его эффективность в ингибировании роста микробов *in vitro* и в клинике при наружном применении [1]. Дальнейшие опыты на животных показали выраженный иммуномодулирующий эффект препарата, в том числе при профилактическом использовании в опытах по заражению неинбредных мышей *Y. pseudotuberculosis* [3].

Функциональная активность фагоцитов во многом определяется уровнем продукции в них активных метаболитов кислорода. При этом увеличение активности может быть опасно и для самой клетки, в связи с чем рост продукции активных метаболитов кислорода ограничивает система антиоксидантной защиты. Модуляция

оксидантно-антиоксидантного баланса препаратами также может влиять на уровень иммунного ответа. Экстракт из голотурий (ЭГ) проявляет высокую антиоксидантную активность, по-видимому обусловленную входящими в его состав каротиноидами и тритерпеновыми гликозидами, и это свойство может лежать в основе его иммуномодулирующего действия [1].

Целью настоящей работы явился анализ влияния ЭГ на уровень продукции активных метаболитов кислорода и активность антиоксидантных ферментов макрофагов мышей, зараженных *Y. pseudotuberculosis*, по лечебной схеме применения – после заражения животных бактериями.

**Материал и методы.** Использовали самок неинбредных мышей массой 14–15 г, находившихся на стандартной диете. В работе руководствовались правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Контрольным животным (1-я группа) вводили физиологический раствор. Для экспериментального инфицирования животным 2–5-й групп внутрибрюшинно однократно вводили *Y. pseudotuberculosis* в дозе 105 микробных клеток (штамм 3D, III серотип, выделенный от больного человека). Животным 3–5-й групп дополнительно в течение трех последующих суток вводили ЭГ *per os* один раз в день в дозах 0,5, 1,0 и 10,0 мг/кг соответственно. Животных 1-й и 2-й групп поили физиологическим раствором (рН 7, 4) в течение трех суток по той же схеме. Отдельно три группы животных (6–8-я) получали только ЭГ в дозах 0,5, 1,0 и 10,0 мг/кг *per os* один раз в день в течение трех дней. Каждая экспериментальная группа состояла из трех-четырёх мышей. По окончании эксперимента (через 45 мин после последнего введения физраствора или ЭГ) животных забивали дислокацией шейных позвонков и отбирали перитонеальный экссудат. В полученных из него макрофагах определяли содержание нитросинего тетразолия (НСТ), по которому судили о продукции активных метаболитов кислорода [5]. Часть клеток отбирали для последующего анализа уровня апоптоза, часть замораживали в жидком азоте и хранили при –20 °С до определения активности антиоксидантных ферментов. Перед определением активности антиоксидантных ферментов клетки разрушали ультразвуком (УЗДН-1, 22 кГц, 25×6 с при 0 °С). Ядра осаждали центрифугированием. В полученных супернатантах спектрофотометрическими методами определяли активность супероксиддисмутазы

(СОД, НФ 1.15.1.1), каталазы (НФ 1.11.1.6) и глутатионредуктазы (ГР, НФ 1.6.4.2) [4]. Все измерения проводили в трипликатах. Количество белка в пробах определяли окраской по Кумасси бриллиантовым голубым G-250.

Для анализа апоптоза суспензии перитонеальных макрофагов (0,3–0,5 млн клеток) центрифугировали (1000g×5 мин при 4 °С), к осадку добавляли 40 мкл 4 % раствора формалина и делали мазки, которые окрашивали Hoechst 33342 [12]. Об уровне апоптоза судили по процентному содержанию ярко-голубых флуоресцирующих клеток.

Результаты обрабатывали статистически, используя для определения достоверности различий между группами t-критерий Стьюдента.

**Результаты исследования.** В течение эксперимента все животные были живы. Однако уже через сутки после введения бактерий у части инфицированных мышей (2–5-я группы) появились визуальные признаки сепсиса, в частности – коагуляция перитонеальной жидкости. На 4-й день у животных, не получавших экстракта (2-я группа), этот феномен зарегистрирован в 67 % случаев. ЭГ в дозе 0,5 и 1 мг/кг проявлял защитное действие, снижая число животных с коагулированной перитонеальной жидкостью в 3-й и 4-й группах до 25 и 33 % соответственно. В то же время экстракт в концентрации 10 мг/кг стимулировал коагуляцию, которая на четвертые сутки была зарегистрирована у всех мышей 5-й группы.

Для понимания механизмов такой про- и противовоспалительной активности ЭГ было проведено исследование состояния оксидантно-антиоксидантного баланса макрофагов. У мышей 2-й группы не было отмечено изменений в продукции НСТ по сравнению с контролем. Однако у инфицированных мышей, получавших дополнительно ЭГ в дозе 1 мг/кг (4-я группа), уровень НСТ был значительно снижен по сравнению с контролем, а доза 10 мг/кг, напротив, стимулировала продукцию НСТ (рис. 1). Введение только экстракта 1 и 10 мг/кг в сутки (7-я и 8-я группы) значительно снижало уровень НСТ в клетках по сравнению с контролем (максимально при дозе 1 мг/кг – на 77 %).

При этом как инфицирование бактериями (2-я группа), так и скармливание экстракта (6–8-я группы) не оказывали влияния на активность СОД в макрофагах мышей по сравнению с контролем (1-я группа). Введение препарата в дозе 0,5 мг/кг инфицированным животным (3-я группа) также не оказывало влияния на активность фермента. Однако экстракт в дозе 1 мг/кг (4-я группа) значительно стимулировал активность СОД (на 64 % по сравнению с контролем), а в дозе 10 мг/кг (5-я группа) снижал активность фермента на 36 % по сравнению с контролем (рис. 2, а).

Активность каталазы в эксперименте изменялась более значительно. Так, во 2-й группе она снижалась на 37 % по сравнению с контролем. В 7-й и 8-й группах зарегистрировано прямое дозозависимое подавление активности фермента: на 39 и 53 % соответственно. Введение

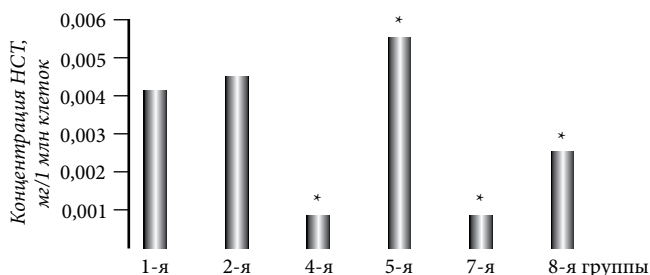


Рис. 1. Влияние ЭГ на уровень НСТ в макрофагах:

\* – разница с контролем статистически значима.

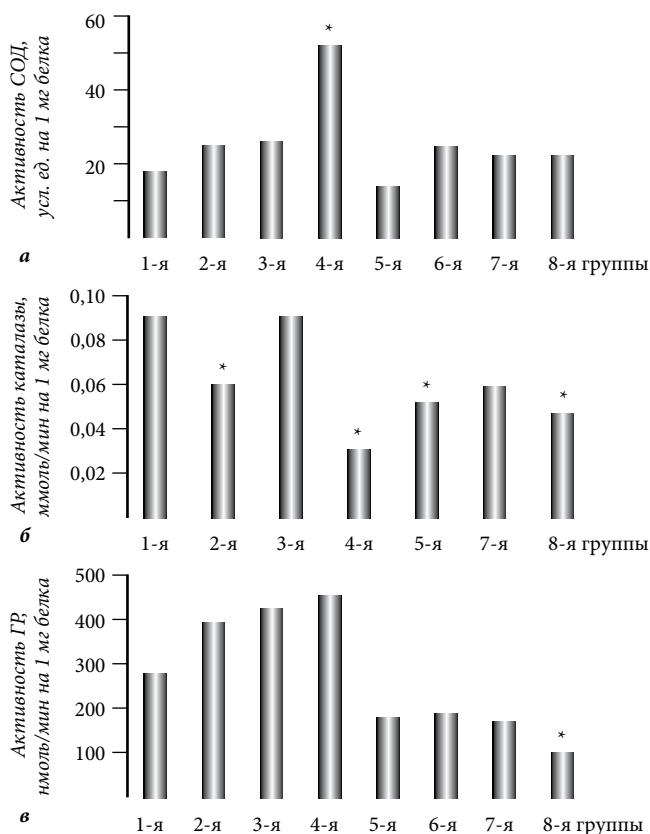


Рис. 2. Изменения активности антиоксидантных ферментов в макрофагах:

а – СОД, б – каталаза, в – ГР; \* – разница с контролем статистически значима.

же ЭГ инфицированным мышам возвращало активность каталазы к контрольным значениям только в 3-й группе. В 4-й и 5-й группах активность фермента оставалась практически на том же уровне, что во 2-й (рис. 2, б).

В макрофагах мышей 2-й группы отмечена тенденция к возрастанию активности ГР (на 40 %). Это свидетельствовало об определенной напряженности антиоксидантной ферментной защиты, связанной со снижением уровня восстановленного глутатиона. В группах 6–8, напротив, отмечено дозозависимое подавление активности фермента (максимальное подавление – на 64 % – при концентрации 10 мг/кг). При введении ЭГ в дозе 0,5 мг/кг инфицированным мышам (3-я группа) активность фермента была практически такой же, как во 2-й группе, превышая контрольное значение в 1,6 раза. Однако в 4-й группе ЭГ (10 мг/кг) уже возвращал активность фермента к контрольному уровню (рис. 2, в).

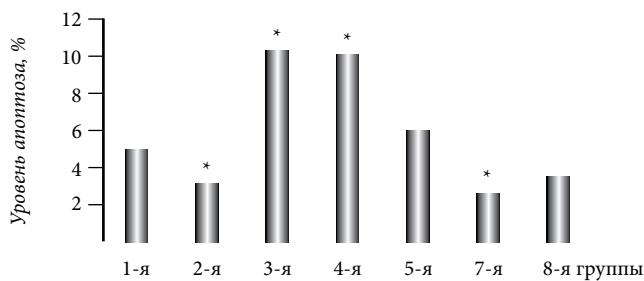


Рис. 3. Уровень апоптоза в макрофагах:

\* – разница с контролем статистически значима.

Уровень апоптоза в макрофагах инфицированных мышей снижался на 32% по сравнению с контролем. У животных 7-й и 8-й групп также происходило снижение уровня апоптоза (статистически значимое в 7-й группе). У инфицированных животных, принимавших ЭГ (3–5-я группы), уровень апоптоза достоверно возрастал в обратной концентрационной зависимости (рис. 3).

**Обсуждение полученных данных.** Ранее нами было показано, что один из важных факторов патогенности *Y. pseudotuberculosis* – термостабильный токсин ТсТур – обладает способностью модулировать апоптоз в нейтрофилах крови крыс *in vitro* [2]. Стратегия бактерий, в том числе *Y. pseudotuberculosis*, направленная на подавление иммунитета макроорганизма, может реализовываться и через другие факторы, например эффекторные белки Yop, которые индуцируют апоптоз и подавляют фагоцитоз в макрофагах путем блокировки респираторного взрыва [14, 15]. Ранее было показано, что заражение мышей бактериями псевдотуберкулеза уже через 45 мин приводит к значительному снижению уровня НСТ в перитонеальных макрофагах [3], что соответствует представлениям, изложенным выше. Однако в настоящих опытах через четверо суток после заражения мышей не отмечено изменений в продукции НСТ макрофагами. При этом не зарегистрировано и существенных изменений активности антиоксидантных ферментов за исключением каталазы, активность которой достоверно снижалась. Уменьшался также уровень апоптоза в макрофагах. Очевидно, к четвертым суткам после заражения происходило восстановление функциональной активности макрофагов, по-видимому, за счет увеличения синтеза ими провоспалительных веществ, что способствовало появлению у части инфицированных животных признаков сепсиса.

Такая динамика изменений клеточного ответа на бактерии, вероятно, обусловлена тем, что реализация иммунного ответа макрофага на патоген может вести и к выживанию, и к смерти клетки, в зависимости от изменений в контролируемых апоптозом системах [14]. Возможно, в более поздние сроки включаются апоптозконтролирующие механизмы, направленные на выживание макрофагов. В частности, известно, что в регуляции апоптоза, помимо каспаз, могут участвовать митогенактивируемые и циклоаденозинмонофосфатзависимые протеинкиназы [14]. В свою очередь

показано участие циклического аденозинмонофосфата в регуляции продукции активных форм кислорода, причем аденозинмонофосфат не только стимулирует активность антиоксидантных ферментов в культуре клеток и снижает концентрацию перекиси водорода, но и может снижать активность каталазы в отсутствие изменений других антиоксидантных ферментов (что указывает на важную роль перекиси водорода в проведении сигнала) [7, 9, 10].

По-видимому, снижение активности антиоксидантных ферментов при первоначальном снижении уровня НСТ в макрофагах при введении бактерий в последующие сроки сопровождается его ростом с соответствующим повышением активности антиоксидантных систем (СОД и ГР) практически до уровня контроля. При этом концентрация перекиси водорода поднимается до значений, превышающих контрольные, на фоне значительно сниженной активности каталазы. Избирательное действие на продукцию перекиси водорода показано и при действии некоторых других бактерий [8, 13]. Повышение же продукции этого соединения может стимулировать синтез циклического аденозинмонофосфата [9]. Наряду с имеющимися данными о вовлеченности циклического аденозинмонофосфата в регуляцию апоптоза, индуцированного *Y. pseudotuberculosis* [2], это свидетельствует о возможности снижения уровня апоптоза в макрофагах через четверо суток после инфицирования в связи с ростом его уровня.

Вместе с тем при трехсуточном введении ЭГ (1 и 10 мг/кг) отмечено обратное концентрационно-зависимое подавление продукции НСТ при сохраненной активности СОД, но не каталазы и ГР, активность которых препарат ингибировал в прямой концентрационной зависимости (достоверно – только при дозе 10 мг/кг).

Таким образом, ЭГ снижает уровень НСТ на фоне уменьшения активности как каталазы, так и ГР, что говорит в пользу антиоксидантного механизма действия: экстракт может эффективно снижать уровень свободных радикалов в клетке [1], тем самым отменяя необходимость поддержания высокой антиоксидантной ферментной защиты. При этом он снижает уровень апоптоза в обратной зависимости от дозы.

Введение инфицированным животным ЭГ в дозе 0,5 мг/кг вызывало рост активности каталазы до контрольного уровня при неизменной активности СОД и ГР, но уровень НСТ оставался сниженным. При дозе 1 мг/кг уровень НСТ у инфицированных животных не превышал таковой при введении ЭГ неинфицированным мышам, не происходило изменений в активности ГР и каталазы, но значительно возрастала активность СОД. Обе дозы экстракта (0,5 и 1 мг/кг) значительно стимулировали уровень апоптоза.

Таким образом, увеличение уровня апоптоза в макрофагах инфицированных животных при введении указанных доз ЭГ связано с низким уровнем продукции НСТ. При этом снижалось и число животных с проявлениями сепсиса по сравнению с инфицированными

мышьями 2-й группы. По-видимому, снижение функциональной активности макрофагов и увеличение их гибели в этих условиях способствовало снижению их провоспалительных эффектов, как это было показано и при действии растительных флавоноидов [11].

Напротив, в 5-й группе наибольшая из использованных концентраций (10 мг/кг) при введении инфицированным животным значительно стимулировала продукцию НСТ, не вызывая достоверного изменения в активности СОД и ГР, а также в уровне апоптоза. Таким образом, при этой дозе происходил рост антибактериальной активности ЭГ при сохранении жизнеспособности самих макрофагов. Однако активность каталазы, но не других ферментов, оставалась сниженной. В этой группе число животных с коагуляцией крови составило 100 %, превысив даже частоту сепсиса во 2-й группе. Таким образом, в условиях бактериального инфицирования стимуляция ЭГ функциональной активности макрофагов сопровождалась, по-видимому, усилением их провоспалительной активности, способствовавшей развитию сепсиса.

В целом при введении ЭГ с лечебной целью в течение трех суток мышам, инфицированным *Y. pseudotuberculosis*, отмечено дозозависимое противодействие эффекту бактерий в макрофагах. Наиболее выраженное, стимулирующее функциональную активность макрофагов действие имело применение ЭГ в максимальной из исследованных концентраций – 10 мг/кг. Однако именно эта доза, повышая функциональную активность макрофагов и их выживаемость, по-видимому, приводила к усилению продукции этими клетками провоспалительных веществ, приводящих к септическим проявлениям. В связи с этим дозы ЭГ 0,5–1 мг/кг, при которых сохранялась сниженная функциональная активность макрофагов, но при этом уменьшалась и частота септических проявлений, могут быть рекомендованы для дальнейшего изучения при лечении сепсиса.

*Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ-ДВО РАН № 08-04-99141.*

#### Литература

#### References

- Dolmatova L.S., Dolmatov I.U., Dobryakov U.I. et al. Antioxidant and biological activity of sea cucumbers extracts *Eupentacta fraudatrix* and ascidian *Halocynthia aurantium*, *Materialy VIII Mezhdunarodnogo sezda "Fitofarm-2004"*. Mikkeli, Finland. 21–23 June 2004. SPb.: Adaptogen, 2004. P. 85–88.
- Dolmatova L.S., Zaika O.A., Nedashkovskaja E.N., Timchenko N.F. Researches of apoptosis modulating influence mechanisms of heat-stable toxin *Yersinia pseudotuberculosis* and correcting effect of rat from the Far Eastern species of sea cucumbers in the rat neutrophils in vitro, *Pacific Medical Journal*. 2010. No. 3. P. 76–80.
- Dolmatova L.S., Zaika O.A., Timchenko N.F. Immunomodulatory effect of the sea cucumbers extract *Eupentacta fraudatrix* in experimental pseudotuberculosis infection, *Kamchatka – zdavnica severo-vostochnykh regionov Rossii: mat. mezhhregionalnoj nauch.-prakt. konf. Petropavlovsk-Kamchatskii, 22–24 oktober 2009*. Petropavlovsk-Kamchatskii: Kamchatpress, 2009. P. 85–91.

- Dolmatova L.S., Romashina V.V. Especially changes in the activity of antioxidant enzymes in different types of white blood cells in patients with chronic alcoholism, *Pat. fiziol. jeksperim. terapija*. 2003. no. 2. P. 17–19.
- Melnikov V.P. The test of the nitroblue tetrazolium reduction by phagocytes, *Lab. delo*. 1991. no. 8. P. 51–53.
- Pomogaeva A.P., Urazova O.I., Kovshirina Ju.V. et al. Clinical and immunological features of children pseudotuberculosis, *Bulleten sibirskoj mediciny*. 2006. V. 5, no. 4. P. 103–110.
- Bellomo F., Piccoli C., Cocco T. et al. Regulation by the cAMP cascade of oxygen free radical balance in mammalian cells, *Antioxid. Redox Signal*. 2006. Vol. 8, No. 3–4. P. 495–502.
- Chakraborty P., Ghosh D., Basu M.K. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent *Leishmania donovani* promastigotes, *J. Parasitol.* 2001. Vol. 87, No. 5. P. 1023–1027.
- Cochrane R., Clark R.B., Maulik N. et al. cAMP-mediated suppression of a Th1 clone associated with an alteration of the intracellular redox environment, *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2003. Vol. 49, No. 2. P. 301–306.
- Ezeamuzie C.I., Taslim N. Reactive oxygen species mediate phorbol ester-stimulated cAMP response in human eosinophils, *Eur. J. Pharmacol.* 2006. Vol. 543, No. 1–3. P. 174–180.
- Fang S.H., Hou Y.C., Chang W.C. et al. Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock, *Life Sci*. 2003. Vol. 74, No. 6. P. 743–756.
- 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. Vol. 124. P. 1038–1044.
- Morganti R.P., Marcondes S., Baldasso P.A. et al. Inhibitory effects of staphylococcal enterotoxin type B on human platelet adhesion in vitro, *Platelets*. 2008. Vol. 19, No. 6. P. 432–439.
- Ruckdeschel K. Immunomodulation of macrophages by pathogenic *Yersinia* species, *Arch. Immunol. Ther. Exp.-Warsz.* 2002. Vol. 50, No. 2. P. 131–137.
- Viboud G.I., Bliska J.B. *Yersinia* outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis, *Ann. Rev. Microbiol.* 2005. Vol. 59. P. 69–89.

Поступила в редакцию 01.04.2011.

#### EFFECTS FROM FAR EASTERN HOLOTHURIANS EXTRACT ON OXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE AND APOPTOSIS IN MICE MACROPHAGES IN CASE OF EXPERIMENTAL PSEUDOTUBERCULOSIS INFECTION

L.S. Dolmatova<sup>1</sup>, O.A. Zaika<sup>1</sup>, N.F. Timchenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pacific Oceanological Institute (43 Baltiyskaya St. Vladivostok 690041 Russian Federation), <sup>2</sup>Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation)

**Summary** – The paper describes effects from the Far Eastern Holothurians extract on nitroblue tetrazolium production level and action of antioxidant ferments of mice macrophages infected with *Yersinia pseudotuberculosis*. As reported, given the 100 % survival rate, 67 % of infected animals had the peritoneal fluid coagulated. The three day introduction of HE into infected animals at the concentration of 0.5–1 mg/kg allowed to suppress functional activity of macrophages and have protective antiseptic effect, thereby decreasing a number of mice with septic manifestations. Given the 10 mg/kg dose, the Holothurians extract appeared to stimulate functional activity of macrophages and increase number of mice with coagulated peritoneal fluid. The authors suggest applying the Holothurians-derived extract in low doses to treat septic manifestations in case of Yersiniosis.

**Key words:** *Yersinia*, *Holothurians extract*, *macrophages*, *sepsis*.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 53–56.