

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 57.084.1+616.995.121

Исследование противовоспалительных свойств секреторно-эксcretорных продуктов плероцеркоидов лентеца чаечного *Dibothriocephalus dendriticus* и лигулы *Ligula interrupta*

А.Н. Павлюченкова^{1,2} , И.А. Кутырев^{1,*} , А.В. Федоров³ ,
М.А. Челомбитько² , О.Е. Мазур¹ , Ж.Н. Дугаров¹ 

¹Институт общей и экспериментальной биологии, Сибирское отделение Российской академии наук, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д. 6;

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40;

³Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: ikutyrev@yandex.ru

В данной работе впервые был исследован противовоспалительный потенциал секреторно-эксcretорных продуктов (СЭП) плероцеркоидов лентеца чаечного *Dibothriocephalus dendriticus* и лигулы *Ligula interrupta* в модели индуцированной липополисахаридом активации макрофагов *in vitro*. В качестве модели макрофагов была использована клеточная линия моноцитов, полученная от пациента с острым моноцитарным лейкозом, ТНР-1. Противовоспалительные свойства СЭП определяли по содержанию в инкубационной среде цитокинов – фактора некроза опухоли и интерлейкина-6 – с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа. Результаты проведенного нами исследования свидетельствуют о том, что СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* обладают выраженным противовоспалительным эффектом, в то время как СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* таким эффектом не обладают. Далее мы исследовали противовоспалительные свойства СЭП *L. interrupta* в модели каррагинан-индуцированного воспаления в «воздушном мешке» у мышей. Было обнаружено значимое уменьшение объема воспалительного экссудата под действием СЭП *L. interrupta*, а также увеличение уровня цитокина интерлейкина-6. В то же время СЭП *L. interrupta* не оказывали влияния на число клеток в 1 мл экссудата, а также на уровень провоспалительного цитокина – фактора некроза опухоли. Низкомолекулярная фракция СЭП *L. interrupta* также увеличивала уровень противовоспалительного цитокина интерлейкина-10, что свидетельствует о более выраженном противовоспалительном эффекте по сравнению с высокомолекулярной фракцией. Полученные результаты, в целом, свидетельствуют о противовоспалительных свойствах СЭП плероцеркоидов *L. interrupta*. Однако механизм противовоспалительного действия не выяснен и требует дальнейшего исследования.

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

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3-1

Введение

Среди множества ключевых направлений биотехнологических и биомедицинских исследований одними из наиболее актуальных являются поиск и выделение новых природных соединений с биотехнологической и биофармацевтической активностью. В последние два десятилетия усилился интерес к использованию иммунорегуляторных свойств секреторно-эксcretорных продуктов (СЭП) гельминтов для терапии воспалительных и аллергиче-

ских заболеваний, включая астму, болезнь Крона, сахарный диабет (включая диабетические язвы) и др., при которых гормональная терапия приводит к тяжелым побочным эффектам [1–3]. На современном этапе развития молекулярной паразитологии биофармацевтический потенциал был исследован, главным образом, у трематод и нематод, вызывающих гельминтозы человека и представляющих большую практическую значимость в медицине [4–6]. Информации о таких исследованиях

в классе Cestoda крайне мало, до начала наших исследований было изучено всего три вида цестод: *Taenia crassiceps*, *Hymenolepis diminuta* и *Echinococcus granulosus* [7–11]. Согласно базам данных известных нуклеотидных и белковых последовательностей, две трети белков цестод по строению значительно отличаются от белков других изученных живых организмов и, соответственно, обладают неизвестными функциями. Поэтому, учитывая то, что цестоды миллионы лет специализируются на жизни внутри живых организмов и взаимодействии с ними, геном цестод можно рассматривать как библиотеку различных неизвестных биологически активных соединений [12]. Участниками нашего коллектива впервые начато систематическое исследование микроанатомических особенностей распределения иммуномодуляторов в организме цестод. Получены первые данные по распределению простагландина E₂, серотонина, гамма-аминомасляной кислоты, пептида Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ в организме *Dibothriocephalus dendriticus* (Nitzsch, 1824) [13–16]. Изучены ультраструктурные механизмы и кинетика вывода секрета на поверхность тегумента цестод *D. dendriticus* и *Ligula interrupta* (Rudolphi, 1810) в ответ на стимуляцию сывороткой крови хозяев – рыб [17].

Имеются сведения о том, что паразиты и их СЭП могут оказывать противовоспалительное действие, в частности, за счет влияния на клетки врожденного иммунитета. Так, было показано, что СЭП *Trichinella spiralis* снижают уровень индуцированной липополисахаридом (ЛПС) воспалительной активации макрофагов, а также стимулирует их поляризацию по M2-противовоспалительному фенотипу [18, 19]. За этот эффект может быть, в частности, ответственен цистатин [20]. Похожий эффект был продемонстрирован для соединений гельминтов, содержащих фосфорилхолин. В частности, конъюгат фосфорилхолина с тетрапептидом тафтсином стимулирует дифференцировку M2-макрофагов и продукцию противовоспалительного цитокина интерлейкина (ИЛ) 10 в ряде моделей воспалительных и аутоиммунных заболеваний [21, 22].

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*. Кроме того, мы изучили противовоспалительные свойства СЭП *L. interrupta* в модели каррагинан-индуцированного воспаления в «воздушном мешке» у самцов мышей линии C57Bl/6.

Материалы и методы

Получение СЭП. Извлеченных из полости тела хозяев плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* очищали от антигенов хозяина путем промывки в 0,65%-ном физрастворе для холоднокровных животных, после чего инкубировали в буфере Хэнкса с добавлением 10⁵ МЕ/л пенициллина и 100 мг/л

линкомицина в течение 6 ч при 4°C. Для выделения белковых фракций СЭП паразитов инкубационную среду центрифугировали в концентрирующих колонках, пропускающих молекулы с молекулярной массой не более 3 кДа (Merck Millipore, Ирландия). Высокомолекулярные (содержащие молекулы массой более 3 кДа) и низкомолекулярные фракции (содержащие молекулы массой менее 3 кДа) СЭП были использованы в дальнейших экспериментах. После количественного измерения белка в полученных фракциях с использованием метода Брэдфорда образцы пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Minisart Sartorius, Германия). Длительное хранение образцов осуществляли при -80°C.

Культивирование клеток и схема их обработки. Исследования проводили на клетках линии острого моноцитарного лейкоза ТНР-1. Для культивирования клеток использовали среду RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 0,3 г/л L-глутамин (ПанЭко, Россия) и 10%-ным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Эксперименты проводили при 37°C и 5% CO₂ на 96- и 12-луночных планшетах для адгезионных культур (Corning, США), клетки в концентрации 500 тыс. клеток/мл для дифференцировки в макрофаги инкубировали 48 ч с добавлением 100 нМ форболового эфира (Sigma, США). Дифференцированные клетки инкубировали на протяжении ночи с СЭП плероцеркоидов в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкг/мл, после чего стимулировали ЛПС (*E. coli* 0127:B8, Sigma, США) в концентрации 100 нг/мл в течение 3 ч для исследования противовоспалительных свойств СЭП паразитов. Для длительного хранения и последующего измерения уровня цитокинов полученный после центрифугирования инкубационной среды супернатант помещали в кельвина-тор при -80°C.

Анализ цитотоксичности. Оценку цитотоксической активности СЭП паразитов проводили с использованием резазуринового теста. Клетки линии ТНР-1 высевали в 96-луночный планшет из расчета 10 тыс. клеток на лунку и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ на протяжении ночи с СЭП плероцеркоидов в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкг/мл. Жизнеспособность клеток определяли через 24 ч после отмывки в среде для культивирования путем инкубации с 1,25 мМ раствором резазурина (Sigma-Aldrich, США) в течение 3 ч при 37°C и 5% CO₂. Флуоресценцию образцов регистрировали с использованием планшетного флуориметра Fluoroskan Ascent (Thermo Fisher Scientific, США) при длинах волн поглощения и эмиссии 560 нм и 590 нм соответственно.

Определение концентрации цитокинов в среде культивирования. Концентрации провоспалительных Th-1-цитокинов – фактора некроза опухоли (ФНО) и ИЛ-6, а также противовоспалительных

Th2-цитокинов – ИЛ-4 и ИЛ-10 – определяли с помощью коммерческих наборов для иммуноферментного анализа (Вектор-Бест, Россия) согласно инструкции производителя.

Модель каррагинан-индуцированного воспаления в «воздушном мешке». Работу проводили на самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 12–15 нед., полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая». Животных содержали в виварии Института общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук. Протокол исследования на мышах был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными Института общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (протокол № 1 от 31.10.2022 г.). Мыши были разделены на четыре группы:

1) Контрольная группа мышей ($n = 5$) без воспаления в «воздушном мешке».

2) Контрольная группа мышей ($n = 5$) с каррагинан-индуцированным воспалением в «воздушном мешке».

3) Опытная группа мышей ($n = 5$) с предварительным введением высокомолекулярной фракции (с массой молекул более 3 кДа) СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* и каррагинан-индуцированным воспалением в «воздушном мешке».

4) Опытная группа мышей ($n = 5$) с предварительным введением низкомолекулярной фракции (с массой молекул менее 3 кДа) СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* и каррагинан-индуцированным воспалением в «воздушном мешке».

Все травматичные для животных манипуляции проводили под наркозом – золетил (Virbac, Франция), 40 мг/кг массы тела. В 1-е сут эксперимента в межлопаточной области мышей формировали подкожные мешки путем инъекции 4 мл стерильного воздуха; на 4-е сут повторно вводили 2 мл воздуха. На 6-е сут в подкожный мешок опытных мышей вводили 500 мкл СЭП плероцеркоидов *L. interrupta*, животным контрольных групп – аналогичный объем физраствора. На 7-е сут внутри мешка индуцировали острое воспаление инъекцией 1 мл 1%-ного раствора каррагинана (Sigma, США) в 0,9%-ном NaCl. Контрольным животным без воспаления вместо каррагинана вводили аналогичный объем физраствора. Через 4 ч после этого мышей выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации. Из подкожного мешка забирали воспалительный экссудат, определяли его объем и содержание клеток в нем. После центрифугирования (15 мин при 1500g и 4°C) супернатант использовали для выявления ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-10 с помощью готовых наборов для иммуноферментного анализа (eBioscience, США).

Анализ и представление данных. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Статистическую обработку результатов

осуществляли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6 путем сравнения групп с помощью двухстороннего дисперсионного анализа (ANOVA) и теста множественных сравнений Даннета. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Гельминты являются мощными иммунорегуляторами, что представляет основу их длительного существования в организме хозяина. Регуляция иммунитета осуществляется путем секреции в организм хозяина иммунорегуляторных веществ белковой и небелковой природы. Паразиты обычно переключают иммунный ответ хозяина с Th1- на Th2-тип, что приводит к подавлению воспалительных процессов [23–25]. В последние годы идет активная разработка средств лечения аутоиммунных и хронических воспалительных заболеваний, основанных на использовании гельминтов, их компонентов и СЭП или отдельных рекомбинантных белков. Была показана эффективность таких средств при лечении воспалительных заболеваний кишечника, ревматоидного артрита, рассеянного склероза, системной красной волчанки, диабета 1-го типа, аутоиммунного энцефаломиелита, сепсиса, аллергического ринита [21, 22, 26–31].

В настоящем исследовании мы оценили противовоспалительный эффект СЭП двух видов цестод, *D. dendriticus* и *L. Interrupta*, *in vitro* и *in vivo*. В своей работе в качестве модели макрофагов мы использовали моноциты линии ТНР-1, дифференцированные в макрофагоподобные клетки с помощью форболового эфира. Данная клеточная линия получена от пациента с острым моноцитарным лейкозом и широко применяется в исследованиях дифференцировки макрофагов [32]. Кроме того, данная клеточная линия уже использовалась для оценки противовоспалительного эффекта СЭП паразитов [33]. В связи с этим выбор данной клеточной линии для исследования противовоспалительных свойств белковых фракций СЭП цестод в модели воспалительной активации макрофагов ТНР-1, индуцированной ЛПС, представляется целесообразным.

Для того чтобы оценить цитотоксическое действие СЭП плероцеркоидов на дифференцированные клетки ТНР-1, мы провели резазуриновый тест. Результаты этого анализа показали, что инкубация клеток в течение 24 ч 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. 1А).

На следующем этапе мы исследовали противовоспалительное действие СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* на ЛПС-индуцированную активацию дифференцированных клеток ТНР-1. ЛПС вызывает поляризацию макрофагов в M1-тип, характеризующийся провоспалительным

фенотипом и секретирующий Th1-цитокينات, в частности ФНО и ИЛ-6 [34, 35]. Считается, что паразиты и их СЭП могут оказывать противовоспалительный эффект, в частности, за счет подавления воспалительной активации макрофагов, а также стимуляции их поляризации по противовоспалительному фенотипу M2 [18, 19, 21, 22]. M2-макрофаги характеризуются противовоспалительными свойствами и секрецией Th2-цитокинин – в частности, ИЛ-4 и ИЛ-10 [35]. Для оценки противовоспалительного действия СЭП плероцеркоидов *D. dendriticus* и *L. interrupta* на ЛПС-индуцированную активацию макрофагов, полученных из моноцитов ТНР-1, определяли концентрации Th1-цитокинин ФНО и ИЛ-6, а также Th2-цитокинин ИЛ-4 и ИЛ-10 в среде культивирования с помощью наборов для иммуноферментного анализа. Анализ результатов данного исследования показал, что предварительная инкубация дифференцированных клеток ТНР-1 с СЭП от плероцеркоидов *D. dendriticus* в течение ночи не влияет на содержание в среде Th1-цитокинин ФНО и ИЛ-6, что свидетельствует об отсутствии действия СЭП на ЛПС-индуцированную активацию (рис. 1Б). 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 содержания Th1-цитокинин ФНО и ИЛ-6 в среде культивирования в ходе ЛПС-индуцированной активации клеток, что свидетельствует о противовоспалительном эффекте (рис. 1В). Предобработка клеток с фракцией СЭП, содержащей молекулы размером менее 3 кДа, также приводила к снижению концентрации провоспалительных цитокинов ФНО и ИЛ-6 на 27% и 40% соответственно (рис. 1В). Стоит отметить, что концентрация Th2-цитокинин 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).

Полученные результаты, в целом, свидетельствуют о том, что СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* обладают выраженным противовоспалительным эффектом в модели ЛПС-индуцированной активации макрофагов ТНР-1, в то время как СЭП от плероцеркоидов *D. dendriticus* таким эффектом не обладают.

На следующем этапе нашего исследования мы протестировали СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* в модели каррагинан-индуцированного острого воспаления в «воздушном мешке» у самцов мышей линии С57Bl/6. В данной модели воспалительный процесс индуцируется под кожей экспериментальных животных путем инъекции каррагинана в подкожный «воздушный мешок», сформированный путем двукратного предварительного введения стерильного воздуха определенного объема в межлопаточную область [36]. Настоящая модель изучения

воспалительного процесса длительное время используется в экспериментальных исследованиях. Она была предложена в 1953 г. Гансом Селье и в настоящее время является одной из общепринятых моделей для тестирования противовоспалительных свойств различных веществ [37–39]. Нами было исследовано влияние СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* на объем лейкоцитарного инфильтрата и число клеток в нем, на содержание провоспалительных цитокинов ФНО и ИЛ-6, а также противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в очаге экспериментального воспаления.

Анализ результатов определения объема воспалительного экссудата показал, что предварительное введение как высокомолекулярной (более 3 кДа), так и низкомолекулярной фракции (менее 3 кДа) СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* в «воздушный мешок» мышам приводит к статистически значимому уменьшению объема воспалительного экссудата после стимуляции каррагинаном (рис. 2А). В то же время не было обнаружено значимого влияния СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* на число клеток, участвующих в воспалении, в 1 мл экссудата из «воздушного мешка» мышей (рис. 2Б). Полученные результаты могут свидетельствовать, что СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* снижают экссудацию и отек, но не влияют на привлечение лейкоцитов в очаг воспаления. Экссудация зависит, в первую очередь, от расширения сосудов. Вазодилатация регулируется, главным образом, оксидом азота и простагландинами PG12, PGD2, PGE2 и PGF2 [40]. Отек является следствием увеличения проницаемости стенки сосудов в очаге воспаления под действием гистамина, брадикинина, лейкотриенов, компонентов комплемента, вещества Р и фактора активации тромбоцитов, а также перехода артериальной гиперемии в смешанную и венозную при замедлении кровотока вследствие спровоцированных медиаторами воспаления тромбогенных нарушений [40]. Привлечение лейкоцитов в очаг воспаления регулируется главным образом цитокинами и хемокинами, в частности, ФНО [41].

Результаты определения цитокинов в очаге воспаления показали, что СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* не влияют на уровень провоспалительного цитокина ФНО (рис. 2В). Поскольку известно, что ФНО имеет критическое значение для миграции лейкоцитов в очаг воспаления, в частности, в модели «воздушного мешка» [41], отсутствие влияния СЭП на уровень ФНО может определять отсутствие влияния на миграцию лейкоцитов.

В то же время, и высокомолекулярная, и низкомолекулярная фракции СЭП увеличивают уровень цитокина ИЛ-6, в то время как каррагинан сам по себе не приводит к увеличению концентрации данного цитокина в «воздушном мешке» (рис. 2В). Интересно отметить, что ИЛ-6 играет

неоднозначную роль в воспалении и наряду с провоспалительными свойствами демонстрирует и противовоспалительные, в частности, в модели каррагинан-индуцированного плеврита у мышей. Так, предварительное введение ИЛ-6 за 5 мин до каррагинана в модели каррагинан-индуцированного плеврита у мышей приводило к снижению экссудации и миграции лейкоцитов. При этом введение антител к ИЛ-6 приводило к снижению притока лейкоцитов, но значительному увеличению экссудации. Эти данные свидетельствуют о том, что ИЛ-6 может оказывать ингибирующее влияние на процесс экссудации в модели воспаления, вызванного каррагинаном [42]. Повышение концентрации ИЛ-6 под действием СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* может лежать в основе его ингибирующего влияния на экссудацию.

Наряду с провоспалительным цитокином ФНО, каррагинан стимулирует небольшую продукцию противовоспалительного цитокина ИЛ-10 (рис. 2В). При этом низкомолекулярная фракция СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* вызывает значимое увеличение уровня ИЛ-10 (рис. 2В). В модели каррагинан-индуцированного плеврита у мышей был продемонстрирован противовоспалительный эффект ИЛ-10 на ранней фазе каррагинан-индуцированного плеврита. Так, ИЛ-10 ингибировал как экссудацию, так и миграцию лейкоцитов через 4 ч после введения каррагинана. Введение же антител к ИЛ-10 приводило к увеличению как притока лейкоцитов, так и экссудации [42]. Противовоспалительный эффект ИЛ-10 был продемонстрирован и во многих других моделях воспаления [43, 44].

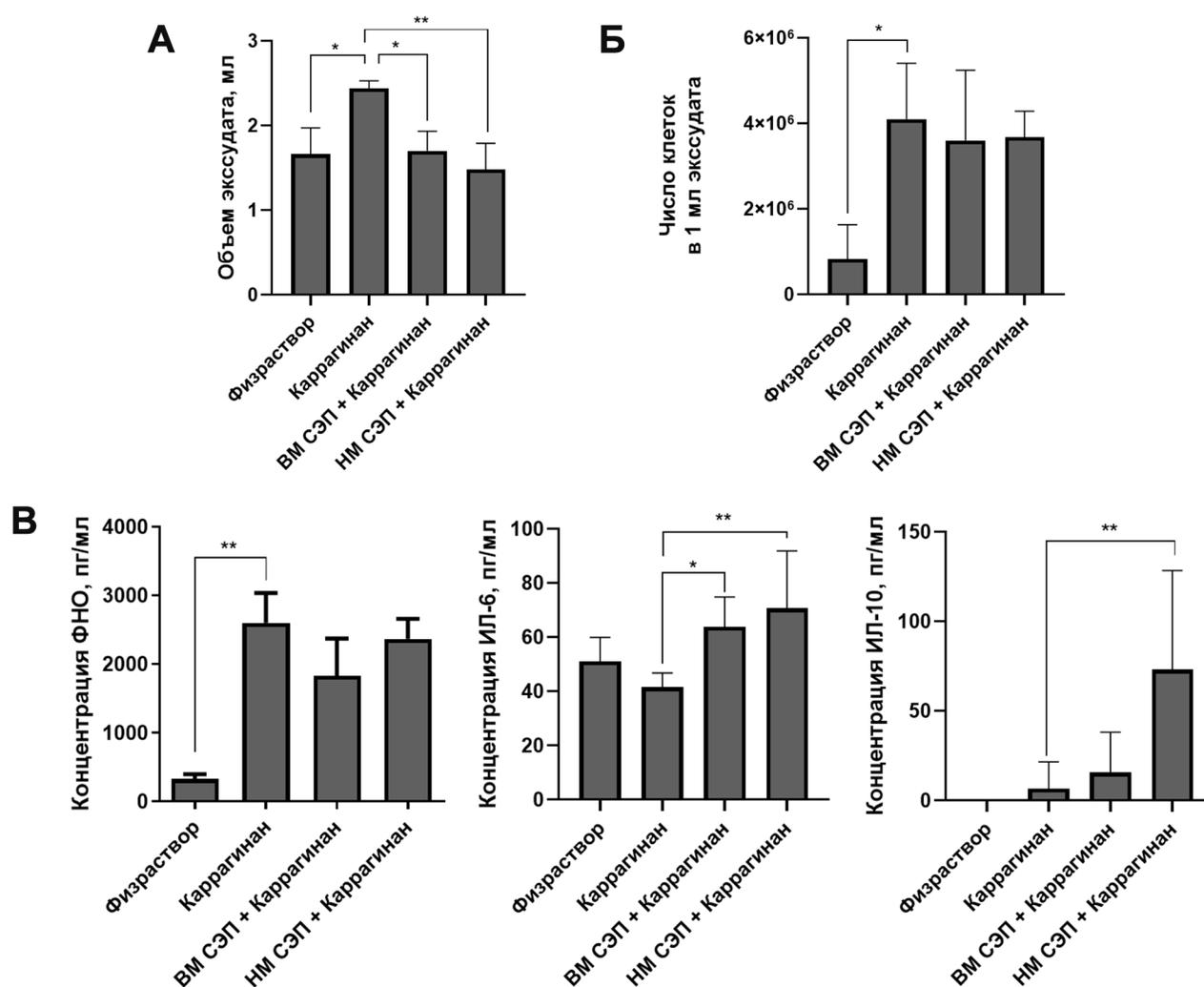


Рис. 2. Влияние высокомолекулярной (ВМ) и низкомолекулярной (НМ) фракций плероцеркоидов *L. interrupta* на каррагинан-индуцированное воспаление в «воздушном мешке» у мышей. За 24 ч до индукции воспаления в предварительно сформированный «воздушный мешок» мышам вводили 500 мкл СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* с добавлением белка в концентрации 100 мкг/мл (высокомолекулярная фракция больше 3 кДа) или аналогичный объем изомолекулярной фракции (менее 3 кДа). Через 24 ч в «воздушный мешок» вводили 1%-ный раствор каррагинана в 0,9%-ном NaCl. Через 4 ч из подкожного мешка забирали воспалительный экссудат, определяли его объем и содержание клеток в нем. В супернатанте определяли концентрацию цитокинов ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-10. Влияние СЭП плероцеркоидов на: **А** – объем экссудата. **Б** – концентрацию клеток в 1 мл экссудата. **В** – уровень цитокинов ФНО, ИЛ-6 и ИЛ-10 в 1 мл экссудата. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (n = 5). * p < 0,05, ** p < 0,01.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о противовоспалительном эффекте как высокомолекулярной, так и низкомолекулярной фракции СЭП плероцеркоидов *L. interrupta*. При этом низкомолекулярная фракция вызывает более выраженный эффект в модели *in vivo*, что делает ее более перспективной для дальнейших исследований. Противовоспалительный эффект СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* может быть связан как с прямым ингибирующим влиянием на активацию воспалительных макрофагов, как показано в модели ЛПС-индуцированной активации дифференцированных клеток ТНР-1, так и со стимуляцией продукции ИЛ-6 и ИЛ-10, первый из которых обладает антиэкссудативным свойством, а второй мощным противовоспалительным эффектом. В то же время точный механизм противовоспалительного действия СЭП плероцеркоидов *L. interrupta* не выяснен и требует дальнейшего исследования. СЭП гельминтов представляет собой смесь из пептидов, углеводов, жиров и небольших органических молекул. В связи с этим поиск отдельных молекул, ответственных за противовоспалительный эффект СЭП, является нетривиальной и сложной задачей. Поскольку низкомолекулярная фракция СЭП лигулы вызвала более выраженный эффект в модели *in vivo*, усилив секрецию ИЛ-10, то дальнейший поиск стоит сосредоточить именно на малых молекулах СЭП лигулы. Известен ряд низкомолекулярных молекул гельминтов, продемонстрировавших терапевтический потенциал в лечении воспалительных и аутоиммунных заболеваний. К таким соединениям относят молекулы, содержащие фосфорилхолин, в частности гликопротеин ES-62 [45, 46] и тафтсин- фосфорилхолин [21, 22, 26–28], полисахарид лакто-N-фукопентоза III [47, 48], простагландин E2 [49], цистатин [20, 31, 50] и др. При

этом защитный эффект некоторых из этих соединений связан со стимуляцией секреции противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и с подавлением секреции ряда противовоспалительных цитокинов, а также со стимуляцией дифференцировки противовоспалительных M2-макрофагов и экспансии регуляторных Т- и В-клеток. В связи с этим можно предположить, что среди малых молекул в низкомолекулярной фракции СЭП лигулы могут присутствовать похожие молекулы.

Авторы выражают благодарность А.В. Елизову, А.В. Селиванову, А.Г. Попову, Д.П. Никонову (Байкальский специализированный участок по борьбе с болезнями рыб и других гидробионтов, Республика Бурятия), О.Б. Жепхоловой (Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук) за помощь в сборе материала. Оценка противовоспалительных свойств секреторно-экскреторных продуктов цестод в моделях ЛПС-индуцированной активации макрофагов ТНР-1 и каррагинан-индуцированного воспаления была проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №22-24-00341). Консультации по методике каррагинан-индуцированного воспаления были получены на биологическом факультете МГУ; поиск и анализ литературных источников, анализ полученных результатов и написание статьи были проведены в научно-исследовательском Институте физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены комиссией Института общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения РАН. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tahapary D.L., de Ruiter K., Martin I., van Lieshout L., Guigas B., Soewondo P., Djuardi Y., Wiria A.E., Mayboroda O.A., Houwing-Duistermaat J.J., Tasman H., Sartono E., Yazdanbakhsh M., Smit J.W., Supali T. Helminth infections and type 2 diabetes: a cluster-randomized placebo controlled SUGARSPIN trial in Nangapanda, Flores, Indonesia. *BMC Infect. Dis.* 2015;18(15):133.
2. Wammes L.J., Mpairwe H., Elliott A.M., Yazdanbakhsh M. Helminth therapy or elimination: epidemiological, immunological, and clinical considerations. *Lancet Infect. Dis.* 2014;14(11):1150–1162.
3. Yazdanbakhsh M., Wahyuni S. The role of helminth infections in protection from atopic disorders. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005;5(5):386–391.
4. Hewitson J.P., Grainger J.R., Maizels R.M. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2009;167(1):1–11.
5. Johnston M.J.G., MacDonald J.A., McKay D.M. Parasitic helminths: a pharmacopeia of anti-inflammatory molecules. *Parasitology.* 2009;136(2):125–147.
6. Maizels R.M., Balic A., Gomez-Escobar N., Nair M., Taylor M.D., Allen J.E. Helminth parasites-masters of regulation. *Immunol. Rev.* 2004;201(1):89–116.
7. Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 1998;84(1):74–81.
8. Reyes J.L., Lopes F., Leung G., Mancini N.L., Matisz C.E., Wang A., Thomson E.A., Graves N., Gilleard J., McKay D.M. Treatment with cestode parasite antigens results in recruitment of CCR2⁺ myeloid cells, the adoptive transfer of which ameliorates colitis. *Infect. Immun.* 2016;84(12):3471–3483.
9. Reyes J.L., Wang A., Fernando M.R., Graepel R., Leung G., van Rooijen N., Sigvardsson M., McKay D.M. Splenic B cells from *Hymenolepis diminuta*-infected mice

ameliorate colitis independent of T cells and via cooperation with macrophages. *J. Immunol.* 2015;194(1):364–378.

10. Matisz C.E., Faz-López B., Thomson E., Al Rajabi A., Lopes F., Terrazas L.I., Wang A., Sharkey K.A., McKay D.M. Suppression of colitis by adoptive transfer of helminth antigen-treated dendritic cells requires interleukin-4 receptor- α signaling. *Sci. Rep.* 2017;7:40631.

11. Soufli I., Toumi R., Rafa H., Amri M., Labsi M., Khelifi L., Nicoletti F., Touil-Boukoffa C. Crude extract of hydatid laminated layer from *Echinococcus granulosus* cyst attenuates mucosal intestinal damage and inflammatory responses in Dextran Sulfate Sodium induced colitis in mice. *J. Inflamm.* 2015;12:19.

12. Kochneva A., Drozdova P., Borvinskaya E. The first transcriptomic resource for the flatworm *Triaenophorus nodulosus* (Cestoda: Bothriocephalidea), a common parasite of holarctic freshwater fish. *Mar. Genomics.* 2020;51:100702.

13. Biserova N.M., Kutylev I.A., Malakhov V.V. The tapeworm *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda) produces prostaglandin E₂, a regulator of host immunity. *Dokl. Biol. Sci.* 2011; 441(1):367–369.

14. Biserova N.M., Kutylev I.A., Jensen K. GABA in the nervous system of the cestodes *Diphyllobothrium dendriticum* (Diphyllobothriidea) and *Caryophyllaeus laticeps* (Caryophyllidea), with comparative analysis of muscle innervation. *J. Parasitol.* 2014;100(4):411–421.

15. Biserova N.M., Kutylev I.A. Localization of prostaglandin E₂, γ -aminobutyric acid, and other potential immunomodulators in the plerocercoid *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda). *Biol. Bull.* 2014;41(3):242–250.

16. Kutylev 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 *Diphyllobothrium dendriticum*: An immunocytochemical and biochemical study. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2017;212:33–45.

17. Kutylev I.A., Biserova N.M., Mazur O.E., Dugarov Z.N. Experimental study of ultrastructural mechanisms and kinetics of tegumental secretion in cestodes parasitizing fish (Cestoda: Diphyllobothriidea). *J. Fish. Dis.* 2021;44(8):1237–1254.

18. Bai X., Wu X., Wang X., Guan Z., Gao F., Yu J., Yu L., Tang B., Liu X., Song Y., Wang X., Radu B., Boireau P., Wang F., Liu M. Regulation of cytokine expression in murine macrophages stimulated by excretory/secretory products from *Trichinella spiralis* *in vitro*. *Mol. Cell Biochem.* 2012;360(1–2):79–88.

19. Wang Z., Hao C., Zhuang Q., Zhan B., Sun X., Huang J., Cheng Y., Zhu X. Excretory/secretory products from adult worms attenuated DSS-induced colitis in mice by driving PD-1-mediated M2 macrophage polarization. *Front. Immunol.* 2020;11:563784.

20. Li H., Qiu D., Yuan Y., Wang X., Wu F., Yang H., Wang S., Ma M., Qian Y., Zhan B., Yang X. *Trichinella spiralis* cystatin alleviates polymicrobial sepsis through activating regulatory macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 2022;109:108907.

21. Blank M., Bashi T., Lachnisch J., Ben-Ami-Shor D., Shovman O., Fridkin M., Eisenstein M., Volkov A., Barshack I., Shoenfeld Y. Helminths-based bifunctional molecule, tuftsin-phosphorylcholine (TPC), ameliorates an established murine arthritis. *PLoS One.* 2018;13(8):e0200615.

22. Novikova N.S., Diatlova A.S., Derevtsova K.Z., Korneva E.A., Viktorovna T.V., Ostrinki Y., Abraham L.,

Quinn S., Segal Y., Churilov L.P., Blank M., Shoenfeld Y., Aharoni R., Amital H. Tuftsin-phosphorylcholine attenuate experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 2019;337:577070.

23. Maizels R.M., Hewitson J.P., Smith K.A. Susceptibility and immunity to helminth parasites. *Curr. Opin. Immunol.* 2012. Vol;24(4):459–466.

24. McSorley H.J., Hewitson J.P., Maizels R.M. Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. *Int. J. Parasitol.* 2013;43(3–4):301–310.

25. Du L., Tang H., Ma Z., Xu J., Gao W., Chen J., Gan W., Zhang Z., Yu X., Zhou X., Hu X. The protective effect of the recombinant 53-kDa protein of *Trichinella spiralis* on experimental colitis in mice. *Dig. Dis. Sci.* 2011;56(10):2810–2817.

26. Segal Y., Blank M., Shoenfeld Y. Tuftsin phosphorylcholine—a novel compound harnessing helminths to fight autoimmunity. *Immunol. Res.* 2018;66(6):637–641.

27. Ben-Ami Shor D., Lachnisch J., Bashi T., Dahan S., Shemer A., Segal Y., Shovman O., Halpert G., Volkov A., Barshack I., Amital H., Blank M., Shoenfeld Y. Immunomodulation of murine chronic DSS-induced colitis by tuftsin-phosphorylcholine. *J. Clin. Med.* 2019;9(1):65.

28. Neuman H., Mor H., Bashi T., Givol O., Watah A., Shemer A., Volkov A., Barshack I., Fridkin M., Blank M., Shoenfeld Y., Koren O. Helminth-based product and the microbiome of mice with lupus. *mSystems.* 2019;4(1):00160–18.

29. Wu Z., Wang L., Tang Y., Sun X. Parasite-derived proteins for the treatment of allergies and autoimmune diseases. *Front. Microbiol.* 2017;8:2164.

30. Nascimento Santos L., Carvalho Pacheco L.G., Silva Pinheiro C., Alcantara-Neves N.M. Recombinant proteins of helminths with immunoregulatory properties and their possible therapeutic use. *Acta Trop.* 2017;166:202–211.

31. Khatri V., Chauhan N., Kalyanasundaram R. Parasite cystatin: immunomodulatory molecule with therapeutic activity against immune mediated disorders. *Pathogens.* 2020;9(6):431.

32. Genin M., Clement F., Fattaccioli A., Raes M., Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer.* 2015;15:577.

33. Długosz E., Basała K., Zawistowska-Deniziak A. Cytokine production and signalling in human THP-1 macrophages is dependent on *Toxocara canis* glycans. *Parasitol. Res.* 2019;118(10):2925–2933.

34. Fleetwood A.J., Lawrence T., Hamilton J.A., Cook A.D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J. Immunol.* 2007;178(8):5245–5252.

35. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *J. Clin. Invest.* 2012;122(3):787–795.

36. Duarte D.B., Vasko M.R., Fehrenbacher J.C. Models of inflammation: carrageenan air pouch. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 2016;72(1):5.6.1–5.6.9.

37. Eteraf-Oskouei T., Mikaily Mirak S., Najafi M. Anti-inflammatory and anti-angiogenesis effects of verapamil on rat air pouch inflammation model. *Adv. Pharm. Bull.* 2017;7(4):585–591.

38. Fehrenbacher J.C., McCarson K.E. Models of inflammation: carrageenan air pouch. *Curr. Protoc.* 2021;1(8):e183.

39. Inada T., Kamibayashi T. Protective effect of the intravenous anesthetic propofol against a local inflammation in the mouse carrageenan-induced air pouch model. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 2021;43(1):100–104.
40. Sherwood E.R., Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* 2004;18(3):385–405.
41. Romano M., Faggioni R., Sironi M., Sacco S., Echtenacher B., Di Santo E., Salmons M., Ghezzi P. Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor. *Mediators Inflamm.* 1997;6(1):32–38.
42. Fröde T.S., Souza G.E.P., Calixto J.B. The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine.* 2002;17(3):149–156.
43. Shouval D.S., Biswas A., Goettel J.A., et al. Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity.* 2014;40(5):706–719.
44. Saraiva M., Vieira P., O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.* 2020;217(1):e20190418.
45. Goodridge H.S., McGuinness S., Houston K.M., Egan C.A., Al-Riyami L., Alcocer M.J., Harnett M.M., Harnett W. Phosphorylcholine mimics the effects of ES-62 on macrophages and dendritic cells. *Parasite Immunol.* 2007;29(3):127–137.
46. Harnett M.M., Kean D.E., Boitelle A. The phosphorylcholine moiety of the filarial nematode immunomodulator ES-62 is responsible for its anti-inflammatory action in arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2008;67(4):518–523.
47. Velupillai P., Harn D.A. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220⁺ cells from schistosoma-infected mice: a mechanism for regulation of CD4⁺ T-cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(1):18–22.
48. Zhu B., Trikudanathan S., Zozulya A.L., Sandoval-Garcia C., Kennedy J.K., Atochina O., Norberg T., Castagner B., Seeberger P., Fabry Z., Harn D., Khoury S.J., Guleria I. Immune modulation by lacto-N-fucopentose III in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin. Immunol.* 2012;142(3):351–361.
49. Laan L.C., Williams A.R., Stavenhagen K., Giera M., Kooij G., Vlasakov I., Kalay H., Kringel H., Nejsum P., Thamsborg S.M., Wuhler M., Dijkstra C.D., Cummings R.D., van Die I. The whipworm (*Trichuris suis*) secretes prostaglandin E2 to suppress proinflammatory properties in human dendritic cells. *FASEB J.* 2017;31(2):719–731.
50. Chantree P., Tarasuk M., Prathaphan P., Ruangtong J., Jamklang M., Chumkiew S., Martviset P. Type I cystatin derived from *Fasciola gigantica* suppresses macrophage-mediated inflammatory responses. *Pathogens.* 2023;12(3):395.

Поступила в редакцию 12.05.2023

После доработки 28.07.2023

Принята в печать 21.08.2023

RESEARCH ARTICLE

Investigation of excretory/secretory products from gull-tapeworm *Dibothriocephalus dendriticus* and ligula *Ligula interrupta* plerocercoids anti-inflammatory properties

A.N. Pavlyuchenkova^{1, 2} , I.A. Kuttyrev^{1, *} , A.V. Fedorov³ ,
M.A. Chelombitko² , O.E. Mazur¹ , Z.N. Dugarov¹ 

¹Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Sakhyanovoy str. 6, Ulan-Ude, 670047, Russia;

²Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–40 Leninskie gory, Moscow, 119992, Russia;

³Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: ikutyrev@yandex.ru

In this work, the anti-inflammatory potential of secretory-excretory products (SEP) of gull-tapeworm *Dibothriocephalus dendriticus* and ligula *Ligula interrupta* plerocercoids was studied for the first time in an *in vitro* model of LPS-induced activation of macrophages. A monocyte cell line derived from a patient with acute monocytic leukemia, THP-1, was used as a macrophage model. The anti-inflammatory properties of SEP were determined by the content of tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-6 cytokines in the incubation medium using commercial kits for enzyme immunoassay. The results of our study indicated that SEP from *L. interrupta* plerocercoids have a pronounced anti-inflammatory effect, while SEP from *D. dendriticus* plerocercoids did not have such an effect. Next, we investigated the anti-inflammatory properties of *L. interrupta* SEP in a carrageenan-induced air-sac inflammation model in mice. A significant decrease in the volume of inflammatory exudate under the

influence of *L. interrupta* SEP was found, as well as an increase in the level of the interleukin-6 cytokine. At the same time, SEP of *L. interrupta* had no effect on the number of cells per 1 ml of exudate, as well as on the level of the pro-inflammatory cytokine TNF. The low molecular weight fraction of *L. interrupta* SEP also increased the level of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which indicates a more pronounced anti-inflammatory effect compared to the high molecular weight fraction. The results obtained, in general, indicate the anti-inflammatory properties of the SEP of *L. interrupta* plerocercoids. However, the mechanism of anti-inflammatory action has not been elucidated and requires further research.

Keywords: *gull-tapeworm, D. dendriticus, ligula, L. interrupta, macrophages, inflammation, parasitic worms*

Funding: The research was supported by Russian Science Foundation, project number 22-24-00341.

Сведения об авторах

Павлюченкова Анастасия Никитична – науч. сотр. лаб. паразитологии и экологии гидробионтов института общей и экспериментальной биологии СО РАН; инженер 1-й категории отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: anabella.gen@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3694-8007>

Кутырев Иван Александрович – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. паразитологии и экологии гидробионтов института общей и экспериментальной биологии СО РАН. Тел.: 8-3012-43-42-25; e-mail: ikutyrev@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1119-6267>

Федоров Артем Валерьевич – науч. сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-17-94; e-mail: artawe@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1741-3330>

Челомбитко Мария Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3902-7812>

Мазур Ольга Евгеньевна – канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. паразитологии и экологии гидробионтов института общей и экспериментальной биологии СО РАН. Тел.: 8-3012-43-42-25; e-mail: olmaz33@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2676-3252>

Дугаров Жаргал Нимаевич – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. паразитологии и экологии гидробионтов института общей и экспериментальной биологии СО РАН. Тел.: 8-3012-43-42-25; e-mail: zhar-dug@biol.bscnet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1264-5394>