ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ИЗ ПЛЕРОЦЕРКОИДОВ ЛЕНТЕЦА ЧАЕЧНОГО *DIBOTHRIOSCEPHALLUS DENDRITICUS* НА ПРОЦЕСС РАНОЗАЖИВЛЕНИЯ У МЫШЕЙ

Челомбитко М. А.¹,

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

Васильева Т. М.²,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры
клеточной биологии и гистологии, vasilyev-n@yandex.ru

Федоров А. В.²,

научный сотрудник кафедры клеточной биологии и гистологии
artawe@mail.ru

Кутырев И. А.^{3,4},

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

Мазур О. Е.³,

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

Аннотация

В данной работе впервые был оценен ранозаживляющий потенциал экстракта плероцеркоидов лентеца чаечного *D. dendriticus* в модели полнослойной кожной раны у мышей. Были проведены как анализ динамики сокращения площади ран, так и гистологическая характеристика процесса заживления. В ходе проведенного исследования не было выявлено влияния экстракта на скорость сокращения ран и на эпителизацию раневой поверхности. В то же

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, биологический факультет (119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1)

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет (119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1)

³ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, д. 6)

⁴ Иркутский государственный университет, НИИ биологии (664003, г. Иркутск, ул. Ленина, 3)

время результаты гистологического анализа показали, что эпидермис в группе мышей, раны которых обрабатывали экстрактом, был менее дифференцированным, а новообразованная соединительная ткань менее зрелой, чем в группе контрольных животных. Кроме того, были обнаружены отличия в составе лейкоцитарного инфильтрата в грануляционной ткани опытных животных — наблюдалось достоверное увеличение числа эозинофилов и тенденция к более низкому содержанию нейтрофилов. Полученные результаты в целом свидетельствуют о том, что обработка ран экстрактом плероцеркоидов замедляет течение репаративных процессов, что, однако, не приводит к значительным изменениям в скорости сокращения ран. Вероятно, данное отличие связано с изменением характера воспалительного процесса на ранних стадиях заживления: под действием экстракта в область повреждения мигрируют эозинофилы, в то время как число привлекаемых нейтрофилов снижается. Это может обуславливать пролонгированную воспалительную фазу и связанное с этим замедление репарации.

Ключевые слова: лентец чаечный, *D. dendriticus*, заживление ран, гельминты.

THE EFFECT OF EXTRACT FROM PLEROCERCIDS OF GULL-TAPEWORM *DIBOTHRIOCEPHALLUS DENDRITICUS* ON WOUND HEALING IN MICE

Chelombitko M. A. ¹,

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

Vasilieva T. M. ²,

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Department
of Cell Biology and Histology, vasilyev-n@yandex.ru

Fedorov A. V. ²,

Researcher, Department of Cell Biology and Histology, artawe@mail.ru

Kutyrev I. A. ^{3,4},

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

¹ Lomonosov Moscow State University, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology (1, Leninskie gory, Moscow, 119991)

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology (1, Leninskie gory, Moscow, 119991)

³ Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (6, Sakhyanovoi st., Ulan-Ude, 670047)

⁴ Institute of Biology at "Irkutsk State University" (3, Lenin st., Irkutsk, 664003, Russia)

Mazur O. E.³,Candidate of Biological Sciences, Researcher, Laboratory
of Parasitology and Ecology of Aquatic Organisms, olmaz33@yandex.ru**Abstract**

In this work, the wound healing potential of the extract from plerocercoids of gull-tapeworm *D. dendriticus* was first estimated in the mouse full-thickness wound model. Both the evaluation of wound closure rate and the histological characteristics of the healing process were performed. In the course of the study, the effect of the extract on contraction and epithelization of wound was not revealed. At the same time, the results of histological analysis showed that the epidermis in the group of mice whose wounds were treated with the extract was less differentiated, and the newly formed connective tissue was less mature than in the group of control animals. In addition, differences were found in the composition of leukocyte infiltrate in the granulation tissue of experimental animals – there was a significant increase in the number of eosinophils and a tendency to a lower content of neutrophils. The results obtained indicate that treatment of wounds with extract from plerocercoids slows down the reparative processes, which, however, does not lead to significant changes in the rate of wound contraction. Perhaps, this difference is due to a change in the early stages of healing: extract stimulates eosinophils migration to the area of damage, while the number of neutrophils decreases. This can lead to a prolonged inflammatory phase and the associated slowdown in repair.

Keywords: gull-tapeworm, *D. dendriticus*, wound healing, helminths.

Введение. В мировой литературе появляется все больше данных, свидетельствующих о ранозаживляющем потенциале гельминтов. Это объясняется тем, что гельминты способны индуцировать Th-2-иммунный ответ, что приводит к подавлению воспаления и стимулирует процессы ранозаживления [1]. Было показано, что плероцеркоиды *Dibothriocephalus dendriticus* (син. *Diphyllbothrium dendriticum*) выделяют простагландин E₂, который обладает иммуномодулирующим и ранозаживляющим эффектом [2]. Таким образом, представляется весьма перспективным использование плероцеркоидов *D. dendriticus* для исследования ранозаживляющего потенциала гельминтов.

Материалы и методы. Работа была проведена на самцах мышей линии C57Bl/6 возрастом 12–15 недель (n = 20), полученных из Питомника лабораторных животных «Столбовая». Мышам под эфирным

³ Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (6, Sakhyanovoi st., Ulan-Ude, 670047)

наркозом в межлопаточной области спины наносили полнослойную кожную рану площадью $\sim 0,5 \times 0,5 \text{ см}^2$. В течение 14 дней с момента операции один раз в сутки на раневую поверхность опытных мышей наносили 50 мкл экстракта. Экстракт получали путем гомогенизации 1400 мг червей в 14 мл холодного раствора Хэнкса. Супернатант, полученный после фильтрации и центрифугирования гомогената, разводили до концентрации 50 мг/мл, аликвотили и хранили при -70°C . Раны контрольных мышей обрабатывали раствором Хэнкса. На 7-е и 14-е сут мышей выводили из эксперимента. Для оценки динамики сокращения площади ран проводили макрофотосъемку раневой поверхности. Для гистологического исследования каждый лоскут с раневой областью фиксировали 10% формалином, затем подвергали рутинной гистологической обработке. Полученные на микротоме срезы депарафинировали и окрашивали гематоксилин-эозином и по Маллори. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism6. Для оценки статистической значимости отличий применяли двусторонний непараметрический критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$; тенденцией считали отличия при $p < 0,1$.

Результаты исследований. Динамика изменения площади раневой поверхности является одним из наиболее показательных критериев, характеризующих заживление ран. Проведенное нами измерение относительной площади раневой поверхности не выявило достоверных отличий в скорости сокращения ран у опытных и контрольных животных (рис. 1).

Рис. 1. Изменение относительной площади раневой поверхности у контрольных (темно-серый цвет) и опытных (светло-серый цвет) мышей

Восстановление эпителиального покрова над областью повреждения является одним из важнейших критериев процесса ранозаживления. Результаты оценки эпителизации ран не выявили достоверных отличий между опытными и контрольными животными (рис. 2А). Однако толщина регенерирующего эпителия у мышей контрольной группы была почти в 2 раза больше, чем в группе опытных животных (рис. 2Б), что отражает его более интенсивную пролиферацию. На 14-е сут после нанесения ран у мышей обеих экспериментальных групп область повреждения была полностью эпителизирована. Разницы в толщине эпидермиса обнаружено не было (рис. 2В). Однако стоит отметить, что эпидермис в группе опытных животных был менее дифференцированным, чем в группе контрольных мышей.

Рис. 2. Показатели эпителизации раневой поверхности у животных опытной и контрольной групп на 7-е сут заживления (А). Показатели толщины регенерирующего эпителия у животных контрольной и опытной групп на 7-е (Б) и 14-е сут (В) заживления. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контрольной группы

Поскольку сила сокращения ран пропорциональна толщине сформированной соединительной ткани, мы анализировали данный параметр на 7-е и 14-е сут заживления. В ходе данного анализа была обнаружена тенденция к более высокому содержанию грануляционной ткани в очаге повреждения у контрольных животных по сравнению с опытными (рис. 3А). На 13-е сут толщина новообразованной соединительной ткани у опытных животных была достоверно больше, чем у мышей контрольной группы (рис. 3Б). Стоит отметить, что новообразованная соединительная ткань в области раневого дефекта контрольных животных на 14-е сут заживления была более зрелой, чем таковая у опытных животных: она содержала меньше сосудов и

состояла преимущественно из зрелых пучков горизонтально ориентированных коллагеновых волокон.

Для более углубленной характеристики процесса заживления была оценена численность нейтрофилов и эозинофилов в составе грануляционной ткани мышей на 7-е сут заживления. В ходе данного анализа в грануляционной ткани опытных животных, по сравнению с контрольными, были обнаружены: достоверное увеличение числа эозинофилов (рис. 4В) и тенденция к более низкому содержанию нейтрофилов (рис. 4Б). В то же время не было выявлено достоверных отличий в суммарном числе гранулоцитов (рис. 4А).

Рис. 3. Показатели толщины грануляционной ткани в зоне раневого дефекта у животных контрольной и опытной групп на 7-е (А) и 14-е (Б) сут заживления.

Звездочкой отмечено достоверное отличие от контрольной группы, решеткой — тенденция к отличию

Рис. 4. Число гранулоцитов (А), нейтрофилов (Б) и эозинофилов (В) в грануляционной ткани у животных контрольной и опытной групп на 7-е сут заживления: гранулоцитов. Звездочкой отмечено достоверное отличие от контрольной группы, решеткой — тенденция к отличию

Заключение. Полученные результаты в целом свидетельствуют о том, что обработка ран экстрактом плероцеркоидов замедляет течение репаративных процессов, что, однако, не приводит к значительным изменениям в скорости сокращения ран. Вероятно, данное отличие связано с изменением характера воспалительного процесса на ранних стадиях заживления: под действием экстракта в область повреждения мигрируют эозинофилы, в то время как число привлекаемых нейтрофилов снижается. Это может обуславливать пролонгированную воспалительную фазу и связанное с этим замедление репарации.

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. Работа выполнена в рамках темы госзадания (№ госрегистрации АААА-А17-117011810039-4) и при финансовой поддержке РФФИ (грант 19-04-00666) и Минобрнауки (№ темы госзадания FZZE-2020-0026).

Литература

1. Chen F., Liu Z., Wu W., Rozo C., Bowdridge S., Millman A., Van Rooijen N., Urban J.F.Jr, Wynn T.A., Gause W.C. An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection // *Nat Med*. 2012. Vol. 18(2). P. 260–266. DOI: 10.1038/nm.2628
2. 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 *Diphyllbothrium dendriticum*: An immunocytochemical and biochemical study // *Mol Biochem Parasitol*. 2017. Vol. 212. P. 33–45. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2017.01.006

References

1. Chen F., Liu Z., Wu W., Rozo C., Bowdridge S., Millman A., Van Rooijen N., Urban J.F.Jr, Wynn T.A., Gause W.C. An essential role for TH2-type responses in limiting acute tissue damage during experimental helminth infection. *Nat Med*. 2012; 18(2):260–266. DOI: 10.1038/nm.2628
2. 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 *Diphyllbothrium dendriticum*: An immunocytochemical and biochemical study. *Mol Biochem Parasitol*. 2017; 212:33–45. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2017.01.006