

УДК 611.018.83:615.37:[615.322:582.272.46]:577.114

*И.Д. Макаренко*<sup>1</sup>, *Н.К. Ахматова*<sup>2</sup>, *И.Б. Семенова*<sup>2</sup>, *Н.Н. Беседнова*<sup>1</sup>, *Т.Н. Звягинцева*<sup>3</sup>

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), <sup>2</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН (105064 г. Москва, М. Казенный пер., д. 5а), <sup>3</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

## **СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ ИЗ МОРСКИХ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ – ИНДУКТОРЫ СОЗРЕВАНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК**

*Ключевые слова:* дендритные клетки, толл-подобные рецепторы, фукоиданы.

Проведено экспериментальное исследование влияния сульфатированных полисахаридов – фукоиданов, выделенных из морских бурых водорослей *Laminaria cichorioides* и *Laminaria japonica*, на созревание дендритных клеток, полученных из костного мозга мышей. Установлено, что фукоиданы индуцируют экспрессию маркера терминальной дифференцировки, усиливают экспрессию активационного маркера, молекул адгезии, поверхностных антигенпредставляющих, костимулирующих молекул и толл-подобных рецепторов на мембранах дендритных клеток, что свидетельствует об их созревании.

Одними из ключевых элементов врожденного иммунитета являются дендритные клетки, способные распознавать патогенные микроорганизмы и участвовать в определении направленности и реализации эффекторных функций [4–6, 8, 9]. Отличительной чертой дендритных клеток по сравнению с другими антигенпрезентирующими клетками является их способность представлять антигены и активировать наивные Т-клетки [4, 5, 8].

Созревание дендритных клеток является сложным процессом, который запускается в условиях инфекции, разрушения тканей и воспаления и инициируется различными факторами. К ним относятся патогенассоциированные молекулярные структуры патогенных микроорганизмов, являющиеся лигандами толл-подобных рецепторов (Toll-Like Receptors – TLR), TNF-подобные сигналы, провоспалительные цитокины и продукты некроза тканей, в норме отсутствующие в межклеточной среде [4–6, 9, 10].

В последние годы получены данные, свидетельствующие о том, что иммуномодуляторы микробного происхождения являются не только индукторами созревания дендритных клеток, но и влияют на их функциональную активность, что определяет направление дифференцировки Т-лимфоцитов [1, 6].

Известно, что сульфатированные полисахариды – фукоиданы из морских бурых водорослей – обладают выраженной иммуномодулирующей, антикоагулянтной, противовирусной, противовоспалительной, противоопухолевой и антибактериальной активностью [2, 7, 11]. Однако практически неизученным остается их действие на созревание и функциональную активность дендритных клеток. В 2008 г. за рубежом появились единичные работы о стимулирующем влиянии фукоидана из бурой водоросли *Fucus vesiculosus*

на экспрессию определенных маркерных генов, связанных с созреванием дендритных клеток [12, 15].

Целью настоящей работы был анализ влияния фукоиданов, выделенных из морских бурых водорослей *Laminaria japonica* и *Laminaria cichorioides* на созревание дендритных клеток костного мозга мышей.

**Материал и методы.** Эксперимент выполнен на 30 мышах линии СВА: самцы весом 18–20 г, полученные из питомника НЦ биомедицинских технологий «Андреевка» (Московская обл.). Животные содержались в стандартных условиях вивария, с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах. Исследования проведены с разрешения комитета по биомедицинской этике НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

Выделение, изучение химического состава и структуры фукоиданов из морских бурых водорослей проведено в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН. Фукоидан, выделенный из бурой водоросли *L. japonica*, является α-L-фуканом, сульфатированным в основном по С-4 остаткам фукозы (молекулярная масса 10–30 кДа), отличается высоким содержанием галактозы. Моносахаридный состав представлен галактозой, маннозой, ксилозой и глюкозой в соотношении 65:20:8:4:3 [14]. Фукоидан, выделенный из бурой водоросли *L. cichorioides*, представляет собой полностью сульфатированный и высокомолекулярный 1→3-α-L-фукан (молекулярная масса 40–80 кДа).

Для получения предшественников дендритных клеток мышей выводили из опыта под эфирным наркозом. Костный мозг гомогенизировали в среде RPMI-1640 (Sigma, США), осаждали центрифугированием и переводили в обогащенную среду культивирования (RPMI-1640 с добавлением 0,1 мг/мл гентамицина сульфата и 10% термоактивированной эмбриональной телячьей сыворотки) в концентрации 10<sup>6</sup> кл./мл. Для развития незрелых дендритных клеток в 1-й и на 3-й день к суспензии костного мозга добавляли 80 нг/мл мышинового рекомбинантного гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и 20 нг/мл интерлейкина-4, который при культивировании ингибирует развитие гранулоцитов и макрофагов.

На 6-е сутки инкубации среду меняли и для индукции созревания дендритных клеток вносили

фукоиданы (50 мкг/мл) из *L. cichorioides* и *L. japonica*. В качестве положительного контроля использовали классический индуктор созревания этих клеток – фактор некроза опухоли- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  – TNF $\alpha$ ) – 20 нг/мл. На 9-е сутки клетки отмывали от среды культивирования и использовали в экспериментальных целях. Для определения поверхностных маркеров, связанных с созреванием, исследовали:

- 1) незрелые дендритные клетки (контроль),
- 2) дендритные клетки, созревшие под действием TNF $\alpha$  (положительный контроль),
- 3) дендритные клетки, созревшие под действием фукоидана из *L. cichorioides*,
- 4) дендритные клетки, созревшие под действием фукоидана из *L. japonica*.

Определение экспрессии поверхностных маркеров проводили при помощи моноклональных антител (Caltag Laboratories, США) против соответствующих антигенов – кластеров дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD): CD34, CD38, CD40, CD11c, CD86, CD83. Кроме этого исследовали экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex – MHC) I и II класса, F4/80, TLR-2, TLR-4 и TLR-9. Клетки отмывали 2 раза холодным фосфатно-солевым буфером с 1% эмбриональной телячьей сывороткой, обрабатывали флуоресцинизиотиоционат- и фикоэритрин-мечеными антителами и фиксировали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 1% параформальдегида. Результаты учитывали на проточном цитометре FACS Calibur (Becton Dickinson, США). Данные анализировали после выделения логического гейта клеточной популяции в dot/plot распределении клеток по их линейному переднему и боковому светорассеянию. Анализировали минимум 10000 событий в гейте. Статистическую обработку проводили при помощи программного пакета WinMdi 2.8 и программы Primer of Biostatistics 4.03.

**Результаты исследования.** Изучение иммунофенотипа дендритных клеток, полученных из костного мозга мышей, проводили на разных стадиях созревания. Установлено, что добавление сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей в среду культивирования индуцировало созревание клеток, о чем свидетельствовала экспрессия на их поверхности маркера терминальной дифференцировки CD83: под действием фукоиданов из *L. cichorioides* –  $10,27 \pm 0,63\%$  и *L. japonica* –  $16,13 \pm 1,45\%$  при отрицательном контроле. Также отмечено выраженное снижение экспрессии маркера незрелых дендритных клеток (CD34) на их поверхности под действием фукоиданов из *L. cichorioides* ( $0,66 \pm 0,33\%$ ) и *L. japonica* ( $0,24 \pm 0,14\%$ ), по отношению к контролю ( $23,2 \pm 0,82\%$ , разница статистически значима).

Увеличение экспрессии активационного маркера CD38 под действием фукоиданов из *L. cichorioides* ( $58 \pm 3,85\%$ ) и *L. japonica* ( $63,6 \pm 3,84\%$ ) по сравнению с контролем ( $5,43 \pm 0,14\%$ ) и молекулы адгезии CD11c

указывало на способность созревших дендритных клеток взаимодействовать с Т-лимфоцитами. При этом отмечено, что фукоидан из *L. cichorioides*, способствовал достоверно более выраженной экспрессии молекулы адгезии CD11c ( $73,63 \pm 2,23\%$ ) по сравнению с фукоиданом из *L. japonica* ( $48,76 \pm 7,35\%$ ) и контролем ( $43,13 \pm 0,55\%$ ).

Для эффективной активации Т-лимфоцит должен получить от антигенпрезентирующей клетки не только антигенспецифический, но и костимулирующий сигнал. Результаты исследования экспрессии молекул MHC I и II классов показали, что фукоиданы из *L. cichorioides* и *L. japonica* вызывали значительное увеличение экспрессии молекулы MHC II класса ( $41,8 \pm 2,91\%$  и  $44,03 \pm 6,73\%$ ), по сравнению с показателями в контроле ( $19,07 \pm 0,63\%$ ). На поверхности дендритных клеток, созревших под действием фукоиданов из *L. cichorioides* и *L. japonica*, показано статистически недостоверное увеличение экспрессии CD40 и значительное увеличение экспрессии CD86 ( $16,2 \pm 1,55$  и  $16,17 \pm 1,93\%$  соответственно, контроль –  $4,0 \pm 0,11\%$ ). Это свидетельствовало о способности созревших дендритных клеток к активации наивных Т-клеток в эффекторные (рис. 1).

Известно, что TLR являются одними из паттерн-распознающих рецепторов дендритных клеток, ответственных за распознавание структур различных классов патогенов, что ведет к выработке и передаче сигналов для экспрессии разнообразных генов иммунного ответа [3, 5, 6, 9, 10]. Результаты исследования показали, что фукоиданы способствуют увеличению экспрессии TLR-2 и TLR-4, но не оказывают влияния на экспрессию TLR-9 на дендритных клетках. Установлено, что увеличение экспрессии TLR-2 под действием фукоиданов из *L. cichorioides* и *L. japonica* составило  $26,5 \pm 1,04$  и  $25,8 \pm 3,78\%$ , контроль –  $14,8 \pm 0,3\%$ , а увеличение экспрессии TLR-4 –  $8,13 \pm 0,08$  и  $7,2 \pm 0,89\%$ , контроль –  $1,46 \pm 0,08\%$  (рис. 2).

**Обсуждение полученных данных.** Результаты исследования указывают на то, что фукоиданы, выделенные из морских бурых водорослей, являются индукторами созревания дендритных клеток, о чем свидетельствуют экспрессия маркера терминальной дифференцировки (CD83), увеличение экспрессии поверхностных молекул антигенного представления (MHC II класса), костимулирующих молекул (CD40 и CD86), молекулы адгезии (CD11c) и активационного маркера (CD38), способствующих образованию иммунного синапса для обмена информацией между антигенпрезентирующими клетками и Т-лимфоцитами и дифференцировке активированных Т-клеток в эффекторные.

В процессе созревания дендритные клетки теряют способность захватывать антиген, но приобретают способность экспрессировать процессированный пептидный антиген в контексте собственных молекул MHC I и II класса. Представление пептида в комплексе

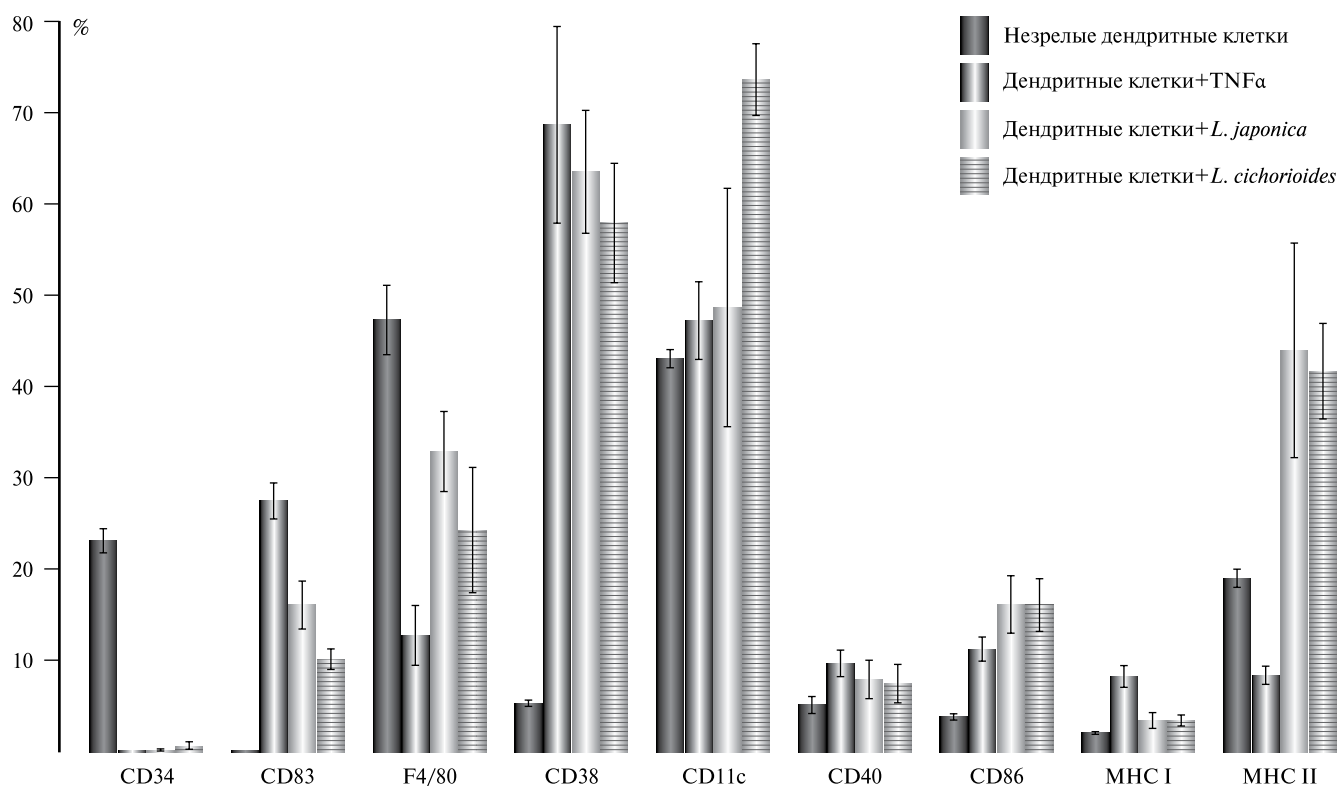


Рис. 1. Влияние фукоиданов на экспрессию поверхностных молекул дендритных клеток.

с МНС I класса необходимо для активации Т-лимфоцитов  $CD8^+$ , тогда как представление пептида в комплексе с МНС II класса необходимо для активации  $CD4^+$ -лимфоцитов (Т-хелперы 1-го типа) [4]. Выявленное увеличение экспрессии молекулы МНС II класса на поверхности дендритных клеток, созревших под действием фукоиданов, является одним из важных показателей их способности осуществлять антигенное представление и позволяет предположить прямое представление этими клетками антигена в комплексе с МНС II класса  $CD4^+$ -лимфоцитам. Увеличение же экспрессии костимулирующих молекул (CD40 и CD86) свидетельствует о том, что полученные дендритные клетки способны активировать наивные Т-лимфоциты.

Известно, что направление дифференцировки  $CD4^+$ -лимфоцитов зависит не только от характера возбудителя или антигена, проникшего в организм, но и от типа паттерн-рецепторов, участвующих в распознавании патогенассоциированных молекулярных структур микроорганизмов [3, 6, 10]. Одними из рецепторов, ответственных за инициацию сигнала и формирование врожденного иммунитета, являются TLR, играющие главную роль в распознавании лигандов различных классов патогенов, а также ряда эндогенных продуктов, выработке и передаче сигналов для экспрессии разнообразных генов иммунного ответа (включая провоспалительные цитокины и интерферониндуцибельные гены). Кроме того, стимуляция TLR вызывает созревание дендритных клеток, что приводит к индукции антигенпредставляющих и костимулирующих молекул и способствует последу-

ющей индукции адаптивного иммунного ответа [3, 5, 6, 9, 10, 13].

Усиление экспрессии TLR-2 и TLR-4 на дендритных клетках под действием фукоиданов из морских бурых водорослей свидетельствует, что созревшие дендритные клетки способны оказывать влияние на стимуляцию различных защитных эффекторных механизмов врожденного иммунитета и индуцировать развитие адаптивного иммунного ответа.

Результаты исследования подтверждают, что сульфатированные полисахариды из *L. cichorioides* и *L. japonica* являются индукторами созревания дендритных клеток. Следует отметить, что действие фукоиданов на их созревание у мышей было сопоставимо с действием классического индуктора созревания дендритных клеток – TNFα. В исследованиях Т.С. Запорожец [2] показано, что сульфатированные полисахариды индуцируют синтез и секрецию провоспалительных цитокинов (TNFα, интерлейкинов 1α и 8) клетками моноцитарно/макрофагального ряда, что способствует экспрессии молекул адгезии, активации нейтрофилов, макрофагов и NK-клеток, усилению фагоцитоза и пролиферации лимфоцитов, а также увеличению синтеза γ-интерферона NK-клетками. Известно, что созревание дендритных клеток иницируется различными факторами, к которым относятся TNF-подобные сигналы и провоспалительные цитокины [4, 5, 6, 9, 10]. Поэтому способность фукоиданов индуцировать синтез последних, в частности TNFα, может являться механизмом, который обеспечивает действие фукоиданов из *L. cichorioides* и *L. japonica* на созревание дендритных клеток.

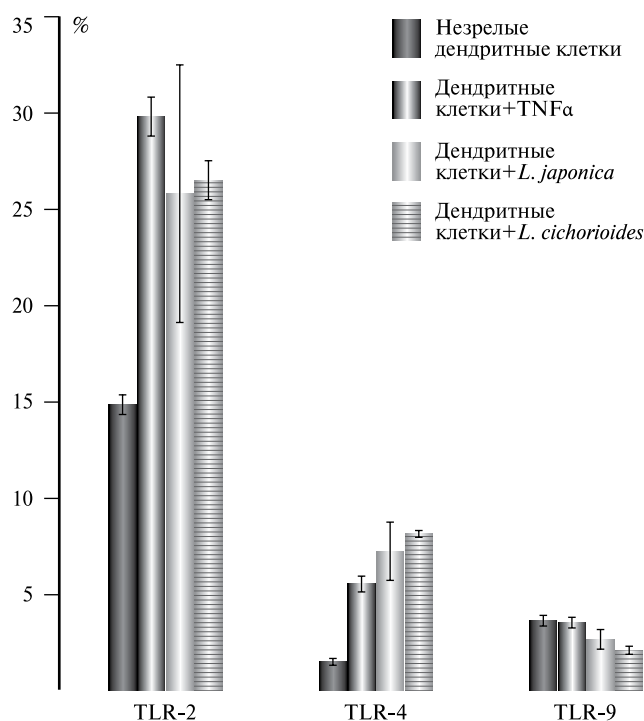


Рис. 2. Влияние фукоиданов на экспрессию TLR.

Полученные результаты согласуются с данными Mi-Hyoung Kim и Hong-Gu Joo [12]. Было показано, что фукоидан из морской бурой водоросли *Fucus vesiculosus* увеличивает экспрессию молекулы МНС II класса, молекул адгезии (CD54) и костимуляции (CD86). Это, по мнению авторов, свидетельствует о способности фукоидана стимулировать экспрессию определенных маркерных генов, связанных с созреванием дендритных клеток.

В работе M. Yang et al. также показано, что фукоидан из *F. vesiculosus* стимулирует созревание моноцитпроизводных дендритных клеток человека, повышает экспрессию костимулирующих и антигенпредставляющих молекул, способствует снижению эндоцитоза, а также усиливает продукцию этими клетками фактора некроза опухоли-α и интерлейкина-12. Полученные авторами результаты показывают, что фукоидан способствует созреванию дендритных клеток и поляризации клеточного Т-хелперного 1-го типа ответа [15].

Таким образом, результаты проведенного эксперимента и данные литературы позволяют считать, что сульфатированные полисахариды из морских бурых водорослей, обладающие широким спектром биологической активности, являются активаторами системы врожденного иммунитета.

#### Литература

1. Ахматова Н.К. Молекулярные и клеточные механизмы действия иммуномодуляторов микробного происхождения на функциональную активность эффекторов врожденного иммунитета: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2006. 48 с.
2. Запорожец Т.С. Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия биополимеров мор-

ских гидробионтов: дис. ... д-ра мед. наук. Владивосток, 2006. 352 с.

3. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С. Врожденные компоненты иммунитета: Toll-подобные рецепторы в норме и при иммунопатологии // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 2005. № 4. С. 96–104.
4. Пащенко М.В., Пинегин Б.В. Основные свойства дендритных клеток // Иммунология. 2001. № 4. С. 7–16.
5. Пащенко М.В., Пинегин Б.В. Физиология клеток врожденной иммунной системы: дендритные клетки // Иммунология. 2006. № 6. С. 368–378.
6. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол., 2007. № 4. С. 93–100.
7. Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds // Glycobiology. 2007. Vol. 17, No. 5. P. 541–552.
8. Frantz S., Vincent K.A., Feron O., Kelly R.A. Innate immunity and angiogenesis // Circ. Res. 2005. Vol. 96, No. 1. P. 15–26.
9. Hochrein H.O., Keeffe M. Dendritic cell subsets and toll-like receptors // Handb. Exp. Pharmacol. 2008. Vol. 183. P. 153–179.
10. Janeway C., Medzhitov R. Innate immune recognition // Annu. Rev. Immunol. 2002. Vol. 20. P. 197–216.
11. Mandal P., Mateu C.G., Chattopadhyay K. et al. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica* // Antivir. Chem. Chemother. 2007. Vol. 18, No. 3. P. 153–162.
12. Mi-Hyoung Kim, Hong-Gu Joo. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells // Immunology Letters. 2008. Vol. 115. P. 138–143.
13. Takeda K., Akira S. Toll-like receptors in innate immunity // Int. Immunol. 2005. Vol. 17, No. 1. P. 1–14.
14. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. et al. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions // J. Exp. marine Biol. Ecol. 2003. Vol. 294, No. 1. P. 1–13.
15. Yang M., Ma C., Sun J. et al. Fucoidan stimulation induces a functional maturation of human monocyte-derived dendritic cells // Int. Immunopharmacol. 2008. Vol. 8, No. 13–14. P. 1754–1760.

Поступила в редакцию 07.04.2009.

#### SULPHATED POLYSACCHARIDES DERIVED FROM SEA BROWN ALGAE AS INDUCING SUBSTANCES FOR DENDRITIC CELL MATURATION

I.D. Makarenkova<sup>1</sup>, N.K. Akhmatova<sup>2</sup>, I.B. Semenova<sup>2</sup>, N.N. Besednova<sup>1</sup>, T.N. Zvyagintseva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the RAMS, Siberian Branch (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia),

<sup>2</sup> I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums, RAMS (5a M. Kazenny Lane Moscow 105064 Russia), <sup>3</sup> Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100-Anniversary Av. Vladivostok 690022 Russia)

**Summary** — The paper presents experimental study into the effects of sulphated polysaccharides — fucoidans derived from the sea brown algae *Laminaria cichorioides* and *Laminaria japonica* on maturation of dendritic cells extracted from the mice bone marrow. As reported, the fucoidans tend to induce expression of terminal differentiation markers, intensify activation marker, adhesion molecules, surface antigen-presenting and bone marrow inducing molecules, as well as Toll-like receptors on the dendritic cell membranes that appears to be indicative of their maturation.

**Key words:** dendritic cells, Toll-like receptors, fucoidans.