

IMMUNOMODULATING ACTIVITY OF THE FAR EASTERN SEA RED ALGAE-DERIVED CARRAGEENANS

I.M. Ermak¹, V.N. Davidova¹, D.L. Aminin¹, A.O. Barabanova¹, E.V. Sokolova, R.N. Bogdanovich², A.M. Polyakova³, T.F. Soloviova¹

¹ Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100-Anniversary Av. Vladivostok 690022 Russia), ² Medical Society, FEB RAS (95, Kirov St. Vladivostok 690022 Russia), ³ Central Research Centre of Epidemiology (3a Novogireevskaya St., Moscow 111123 Russia)

Summary – Both in clinic and laboratory, the authors have studied immunomodulating effects of sulphated polysaccharides – carrageenans – derived from the red algae of Gigartinales and Tichocarpaceae families (Sea of Japan). In vitro studies allowed to de-

fine dependence between immunomodulating activity and polysaccharides structure. Lambda-carrageenan was deemed to have the most pronounced biological effect proved to increase calcium ion concentration in mice lymphocytes, generate active forms of oxygen in macrophages and induce apoptosis in Ehrlich's carcinoma cells. Kappa and kappa/iota-carrageenans showed higher capability to induce generation of pro-inflammatory cytokines. There was concentration dependence between cytokine-inducing activity and polysaccharide concentration. Clinical testing allowed to note positive effects of carrageenan used in integrated treatment of patients suffering from acute enteric infections on the immune system and hemostatic parameters.

Key words: carrageenans, cytokines, phagocytosis, immunological status.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 40–45.

УДК 612.112:612.017.1:579.841.11:577.114

Т.П. Смолина¹, Т.С. Запорожец¹, Р.П. Горшкова², Е.Л. Назаренко²

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159)

РАННЯЯ АКТИВАЦИЯ ЛИМФОЦИТОВ И МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА КОМПОНЕНТАМИ ПРОТЕОБАКТЕРИЙ *PSEUDOALTEROMONAS NIGRIFACIENS*

Ключевые слова: липополисахарид, полисахарид, морские бактерии, активация лимфоцитов.

Методом двуцветного анализа на проточном цитометре определяли влияние липополисахарида, выделенного из морских протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, и его структурных компонентов на раннюю активацию мононуклеаров клеток крови человека. Липополисахарид, О-специфический полисахарид (О-ПС) и олигосахарид кора (Cor) повышали уровень экспрессии CD69 и CD25 на лимфоцитах CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ и CD69 на моноцитах. Липополисахарид увеличивал экспрессию CD95 на клетках CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, а О-ПС и Cor – только на CD4⁺. Ни один из исследуемых гликополимеров не вызывал статистически значимого изменения уровня экспрессии CD38. О-ПС и Cor сильнее увеличивали экспрессию активационных маркеров на моноцитах и лимфоцитах, чем липополисахарид. В большей степени О-ПС и Cor активировали клетки, способные оказывать цитотоксическое действие.

Морские бактерии являются важной составной частью морских экосистем и могут быть получены практически из каждого образца морской воды и морских животных. Многие выделенные из морских микроорганизмов гликополимеры имеют в своем составе уникальные структурные компоненты и могут оказывать биологическое действие, нередко более выраженное, чем аналогичные вещества из наземных организмов, однако эти полимеры еще недостаточно изучены. В составе полисахаридов морских протеобактерий рода *Pseudoalteromonas* идентифицированы редкие и необычные N-ациламино- и кислые моносахариды, а также высшие сахара [1].

Ранее нами было установлено, что кислые капсульный и клеточные полисахариды морских микроорганизмов рода *Pseudoalteromonas* обладают способностью

блокировать адгезию патогенных микроорганизмов на клетках животных и человека [4]. Существенное значение в обеспечении антиадгезивного действия имеет наличие в гликополимерах ацетильных групп и/или углеводной последовательности, состоящей из остатков D-глюкозы, D-маннозы и D-глюкуроновой кислоты [4]. Большую роль в снижении степени адгезии бактерий липополисахаридом *Pseudoalteromonas nigrifaciens* (штамм КММ 156) играет его фрагмент – О-специфический полисахарид (О-ПС), в то время как другой фрагмент – олигосахарид кора (Cor) – не влияет на процесс адгезии [5].

Липополисахарид (ЛПС) и другие компоненты бактерий представляют собой биологические сигнальные молекулы, способные активизировать врожденные и приобретенные системы защиты организма. Цель настоящей работы: определить влияние ЛПС *P. nigrifaciens* на активацию лимфоцитов и моноцитов человека, а также выяснить, оказывают ли стимулирующее действие на лимфоциты и моноциты компоненты ЛПС, лишенные липида А (О-ПС и Cor). Для этого определяли экспрессию маркеров активации – кластеров дифференцировки (Cluster of Differentiation – CD) 69, 25, 38 и 95 на лимфоцитах. Раннюю активацию моноцитов оценивали по экспрессии CD69.

Материал и методы. Гликополимеры получены из бактерий *P. nigrifaciens* штамма КММ 156, выделенного из ткани желудка дальневосточного двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* (бухта Троица) и находящегося в коллекции морских микроорганизмов (ТИБОХ ДВО РАН). О-ПС, входящий в состав ЛПС, имеет идентичное строение с капсульным полисахаридом и состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих два остатка L-рамнозы,

Смолина Татьяна Павловна - канд. биол. наук, в.н.с. лаборатории иммунологии НИИЭМ СО РАМН; тел.:8 (4232) 44-24-46; e-mail: tsmol@mail.ru.

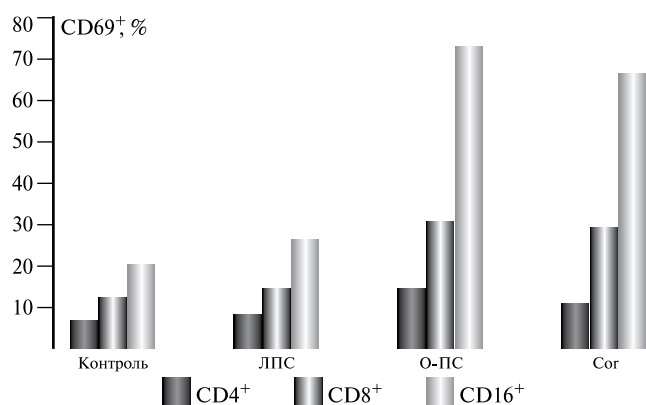


Рис. 1. Влияние гликополимеров, выделенных из морских протеобактерий *P. nigrifaciens*, на экспрессию CD69.

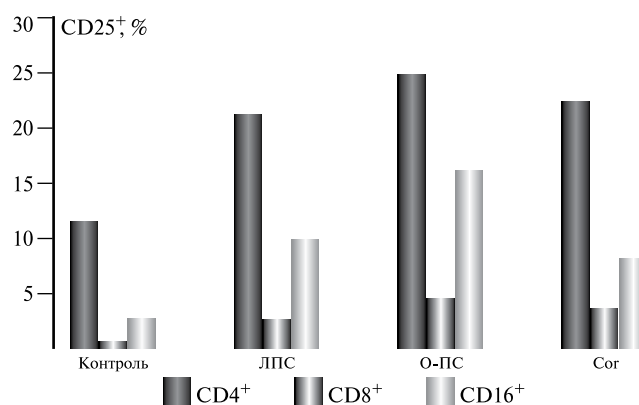


Рис. 2. Влияние гликополимеров, выделенных из морских протеобактерий *P. nigrifaciens*, на экспрессию CD25.

один остаток 2-ацетида-2-дезоксид-*D*-глюкозы и один остаток 3-*O*-[(*R*)-1-карбоксиэтил]-*D*-глюкозы (глюколактиловой кислоты) [2]. В состав ЛПС, кроме *O*-специфического ПС, входит липид А в аномально низком количестве и олигосахарид кора.

Материалом для исследования служила периферическая кровь с гепарином (25 БД/мл), полученная от здоровых доноров. Выделение мононуклеаров проводили путем центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности фикола-верографина (1,077 г/мл). Клетки доводили до концентрации 2×10^6 /мл. Культивирование проводили в полной культуральной среде: RPMI-1640, 0,01 М HEPES, 200 мМ L-глутамин, 100 мг/мл гентамицин. Исследуемые гликополимеры вносили в кровь или в культуру мононуклеаров в конечной концентрации 20 мкг/мл (оптимальную дозу определили предварительно). Контрольные пробы инкубировали с полной культуральной средой.

Экспрессию активационных маркеров на поверхности клеток оценивали через 4 и 24 часа методом двуцветного цитометрического анализа в программе Cell Quest на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson) с использованием моноклональных антител к молекулам CD45-FITC/CD14-PE, CD3-FITC, CD4-FITC, CD8-FITC, CD16-FITC, CD14-FITC, CD69-PE, CD38-PE, CD25-PE, CD95-PE (Beckman Coulter) и соответствующих изотипических контролей. Для корректного исключения из зоны анализа всех частиц, которые не соответствовали по размерам и гранулярности живым лимфоцитам, вводили необходимые логические ограничения в гистограммы распределения частиц по малоугловому, боковому светорассеянию и CD45. В каждой пробе анализировали не менее 10 000 клеток.

Результаты представлены как процент лимфоцитов или моноцитов, экспрессирующих активационный маркер. Статистическую обработку полученных данных проводили методами непараметрической статистики с использованием пакета компьютерных программ GEOSTAT, которые включали расчет медианы и квартильного размаха (значения 75-го и 25-го перцентилей), а также оценку различий с использованием критерия Вилкоксона для связанных групп [3].

Результаты исследования. После 4 часов культивирования крови с любым из гликополимеров – ЛПС, О-ПС или Сог – количество моноцитов, экспрессирующих CD69, увеличивалось по сравнению с контролем. Уровень CD14⁺CD69⁺ (в процентах от CD14⁺) после стимуляции ЛПС возрастал до 30,23% (25,69–58,95%) при контрольном значении 21,13% (17,39–33,50%). Более значительное повышение экспрессии CD69 на моноцитах вызывали О-ПС и Сог. Количество моноцитов, экспрессирующих на мембране CD69, после стимуляции О-ПС достигало 67,24% (62,44–79,81%), после воздействия Сог – 59,91% (53,71–75,53%). Известно, что лимфоциты в интактном состоянии не экспрессируют CD69. После 4 часов инкубации этот маркер появлялся на контрольных лимфоцитах и лимфоцитах, стимулированных любым из исследуемых гликополимеров. Уровень лимфоцитов CD69⁺ в контроле был невысок: 3,41% (3,55–9,18%), ЛПС увеличивал их количество в 2 раза, а О-ПС и Сог – более чем в 4,5 раза.

Через 24 часа инкубации определяли уровень экспрессии CD69, CD38, CD25 и CD95 на лимфоцитах и их популяциях (CD4⁺, CD8⁺), а также на NK-клетках, для выявления которых использовали моноклональные антитела к CD16. Количество лимфоцитов CD69⁺ во всех пробах увеличивалось по сравнению с 4-часовым сроком культивирования. Самый высокий уровень наблюдали в пробах, стимулированных О-ПС – 23,30% (20,00–31,23%) и Сог – 25,50% (22,90–30,52%). Статистически значимое увеличение экспрессии CD69 выявили на Т-лимфоцитах CD4⁺, CD8⁺ и на NK-клетках (рис. 1). Наиболее значительное повышение уровня этого маркера CD69 отмечалось на NK-лимфоцитах, активированных О-ПС и Сог.

Доля NK-клеток, экспрессирующих CD69, в результате активации О-ПС увеличивалась до $72,70 \pm 9,90\%$, инкубирование лимфоцитов с Сог приводило к повышению экспрессии этого маркера до $66,38 \pm 7,71\%$ (контроль – $20,29 \pm 3,42\%$). Все исследованные гликополимеры статистически значимо увеличивали экспрессию CD25 на всех исследуемых популяциях лимфоцитов (рис. 2). Экспрессия CD95 под действием ЛПС возрастала на клетках CD4⁺, CD8⁺

и CD16⁺, в то время как О-ПС и Сог стимулировали экспрессию этого антигена только на клетках CD4⁺ (рис. 3). Все исследуемые вещества после 24-часовой инкубации не приводили к статистически значимому изменению экспрессии CD38 на лимфоцитах.

Обсуждение полученных данных. В результате исследования влияния ЛПС *P. nigrifaciens* и его структурных компонентов на процесс ранней активации клеток крови выявлено стимулирующее действие всех исследуемых гликополимеров на моноциты, Т- и NK-лимфоциты человека. Это проявлялось в увеличении экспрессии активационных молекул на мембранах клеток.

CD69 не экспрессируется на покоящихся лимфоцитах периферической крови, но появляется после активации лимфоцитов в течение 1–2 часов после возбуждения. Экспрессия CD69 требует синтеза матричной РНК и является очень непостоянной, так как матричная РНК быстро деградирует под действием функционального мотива AU-rich [10]. CD69 вовлечен в ранние преобразования лимфоцитов, моноцитов и активацию тромбоцитов. Экспрессируясь на мембране моноцитов, CD69 действует как сигнал трансдукции, что приводит к секреции провоспалительных медиаторов (простагландины E2 и F1, лейкотриен B4) и увеличению продукции оксида азота [7]. CD69 действует как молекула костимуляции для Т-клеточной активации и пролиферации, включая механизм увеличения концентрации внутриклеточного Ca⁺⁺, синтез различных цитокинов и их рецепторов. Установлена роль CD69 в лизисе, осуществляемом активированными NK-клетками [6].

Все исследуемые вещества уже через 4 часа инкубации с клетками крови увеличивали уровень экспрессирующих CD69 моноцитов и лимфоцитов. При этом гликополимеры О-ПС и Сог больше влияли на экспрессию маркера на моноцитах и лимфоцитах, чем ЛПС. Возможно, ЛПС не оказывал прямого активирующего воздействия на Т-лимфоциты, а действовал опосредованно – через активацию моноцитов, так как их инкубировали совместно с лимфоцитами. Из литературы известно, что ЛПС не стимулирует экспрессию CD69 на чистых В- и Т-клетках, экспрессия этого маркера увеличивается лишь при совместном культивировании В- и Т-клеток с моноцитами [14]. К примеру, ЛПС *Salmonella* изначально индуцирует активацию моноцитов, которые затем активируют Т-клетки через B7/CD28-контактзависимый механизм костимуляции [12]. В процессе стимуляции пролиферативной активности NK-клеток ЛПС регулирующая роль также принадлежит моноцитам [9].

Продолжение инкубации гликополимеров с лимфоцитами до 24 часов приводило к дальнейшему росту уровня CD69⁺-лимфоцитов. Так же как и после 4 часов инкубации, более эффективное действие через 24 часа оказывали О-ПС и Сог. Все гликополимеры активировали обе субпопуляции Т-лимфоцитов: CD4⁺ и CD8⁺. При сравнении процентного содержа-

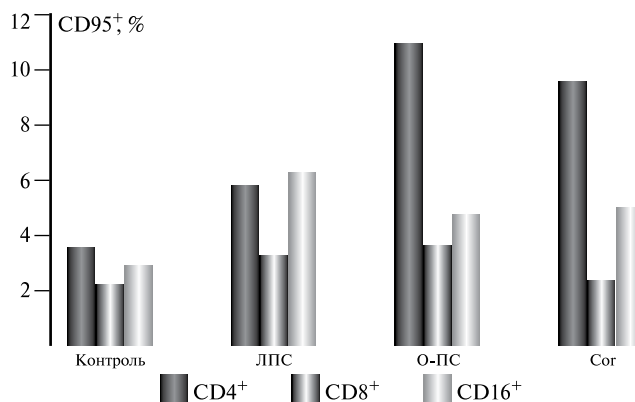


Рис. 3. Влияние гликополимеров, выделенных из морских протеобактерий *P. nigrifaciens*, на экспрессию CD95.

ния экспрессирующих CD69 лимфоцитов в этих субпопуляциях отмечено, что CD69-позитивных лимфоцитов было больше среди CD8⁺-лимфоцитов.

Увеличение уровня экспрессии CD69 на NK-клетках (CD16⁺) индуцировали все исследуемые гликополимеры, однако более значительный эффект, когда более 65% NK-клеток относились к популяции CD69⁺, наблюдали после воздействия О-ПС и Сог. Известно, что экспрессия CD69 на NK-клетках в большей степени связана с их цитотоксической функцией, в то время как процесс пролиферации характеризуется экспрессией CD25 [6]. Поскольку большее количество натуральных киллеров, активированных О-ПС и Сог, экспрессировали CD69, а не CD25, то можно предположить, что эти гликополимеры в большей степени усиливают их цитотоксичность, а не пролиферацию.

CD69 имеет прямое отношение к активации генов, ответственных за синтез интерлейкина-2, и сигналы, поступающие с CD69, вызывают увеличение как продукции этого цитокина, так и количества рецепторов к нему на клетках CD25⁺ [10], экспрессию которых принято считать одной из ключевых стадий процесса активации. ЛПС и его структурные компоненты увеличивали экспрессию CD25 на обеих субпопуляциях Т-клеток (CD4⁺ и CD8⁺) и на NK-клетках. Наиболее значительное увеличение экспрессии CD25 на популяциях CD4⁺, CD8⁺ и CD16⁺ выявлено при инкубации лимфоцитов с О-ПС. Более стимулирующее воздействие все исследуемые гликополимеры оказывали на лимфоциты CD8⁺ и CD16⁺. С одной стороны, ЛПС, О-ПС и Сог активировали лимфоциты, характеризующиеся эффекторным потенциалом, с другой – приводили к увеличению процентного содержания популяции CD4⁺CD25⁺, в которой присутствуют как пролиферирующие, так и регуляторные Т-лимфоциты, играющие важную роль в осуществлении контроля иммунной системы путем супрессирования пролиферации эффекторных клеток. Из литературы известно, что ЛПС увеличивает количество регуляторных Т-лимфоцитов, оказывающих прямое ингибирующее действие на эффекторные функции NK-клеток, как показано

на моделях *in vitro* [8, 13]. Однако результаты экспериментов *in vivo* свидетельствуют о том, что регуляторные Т-лимфоциты не влияют на продукцию γ -интерферона натуральными киллерами, стимулированными ЛПС [8].

CD38 – трансмембранный гликопротеин, представляющий собой фермент, регулирующий концентрацию цитоплазматического кальция, обеспечивает проводимость сигнала активации в Т-клетки и является регулятором в гуморальном ответе, так как участвует и в В-клеточной активации. Клетки с высоким уровнем экспрессии CD38 проявляют низкую пролиферативную активность, но обладают высоким потенциалом в продукции интерлейкина-2 и γ -интерферона. CD38 обладает сходством с молекулами адгезии – легко слущивается с поверхности [12]. Возможно, из-за этой способности отсутствуют статистически значимые изменения его экспрессии после введения в культуру ЛПС или его компонентов. На экспрессию проапоптотического маркера CD95 ЛПС и выделенные из него компоненты оказывали различное действие. В то время как ЛПС увеличивал экспрессию CD95 и на Т-лимфоцитах (CD4⁺ и CD8⁺), и NK-клетках, О-ПС и Сог оказывали влияние только на CD4⁺-лимфоциты, увеличивая количество клеток с CD95. Отношение CD4⁺CD95⁺ к CD4⁺ было выше в тех случаях, когда стимуляторами служили О-ПС и Сог, а не ЛПС.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЛПС *P. nigrifaciens* штамма КММ156, выделенного из моллюска *S. grayanus*, оказывал активирующее действие на моноциты, Т- и NK-лимфоциты, увеличивая количество клеток, экспрессирующих активационные молекулы: на моноцитах – CD69, на Т- и NK-клетках – CD69, CD25 и CD95. Гликополимеры О-ПС и Сог оказывали более сильное влияние на моноциты и лимфоциты, чем ЛПС. В большей степени они активировали клетки, способные оказывать цитотоксическое действие. Таким образом, выделенные компоненты ЛПС не только не потеряли биологической активности, но стали оказывать более выраженное, чем сам ЛПС, действие, направленное в большей степени на эффекторные популяции лимфоцитов. В связи с этим представляется перспективным дальнейшее исследование этих гликополимеров для определения возможности их использования в качестве иммуномодуляторов.

Работа поддерживается грантом РФФИ 08-04-12069-офи.

Литература

1. Горшкова Н.М. Таксономические критерии в систематике морских аэробных протеобактерий: автореф. дис. ... кан. биол. наук. Владивосток. 2000. 26 с.
2. Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л., Зубков А.А. и др. Структура повторяющегося звена кислого полисахарида *Alteromonas haloplanktis* КММ156 // *Биоорган. химия*. 1993. Т. 19, № 3. С. 327–336.
3. Смолин В.А. Математическое моделирование в геологии и геофизике (Статистика). Владивосток: ДВГУ. 2007. 232 с.
4. Смолина Т.П., Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л. и др. Блокирование адгезии *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью поли-

- сахаридов, выделенных из морских микроорганизмов *Pseudoalteromonas* // *Тихоокеанский мед. журн.* 2001. № 2. С. 18–20.
5. Смолина Т.П., Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л. и др. Ингибирование адгезии прокариотических и эукариотических клеток липополисахаридом и его фрагментами из морских протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* КММ156 // *Антибиотики и химиотерапия*. 2005. № 5–6. С. 4–6.
 6. Clausen J., Vergeiner B., Enk M. et al. Functional significance of the activation-associated receptor CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells // *Immunobiology*. 2003. V. 207, No. 2. P. 85–93.
 7. De Maria R., Cifone M.G., R. Trotta R. et al. Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors // *Exp. Med.* 1994. Vol. 180. P. 1999–2004.
 8. Ghiringhelli F., Menard C., Terme M. et al. CD4⁺CD25⁺ T-regulatory cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner // *Exp. Med.* 2005. Vol. 202, No. 8. P. 1075–1085.
 9. Goodier MR, Londei M. Lipopolysaccharide stimulates the proliferation of human CD56⁺CD3 NK cells: a regulatory role of monocytes and IL10 // *Immunology*. 2000. Vol. 165, No. 1. P. 139–147.
 10. Marzio R., Mauël J., Betz-Corradin S. CD69 and regulation of the immune function // *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1999. Vol. 21, No. 3. P. 565–582.
 11. Mattern T., Flad H., Brade L. et al. Stimulation of human T-lymphocytes by LPS is MHC unrestricted but strongly dependent on B7 interaction // *Immunology*. 1998. Vol. 160. P. 3412–3418.
 12. Sandoval-Montes C., Santos-Argumedo L. CD38 is expressed selectively during the activation of a subset of mature T-cells with reduced proliferation but improved potential to produce cytokines // *Leukocyte Biology*. 2005. Vol. 77. P. 513–521.
 13. Trzonkowski P.E., Szmit J., Mysliwska A. et al. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8⁺ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction // *Clin. Immunol.* 2004. Vol. 112. P. 258–267.
 14. Vilanova M., Tavares D., Ferreira P. et al. Role of Monocytes in the Up-Regulation of the Early Activation Marker CD69 on B and T Murine Lymphocytes Induced by Microbial Mitogens Scandianavian // *Immunology*. 1996. Vol. 43, No. 2. P. 155–163.

Поступила в редакцию 15.04.2009.

EARLY ACTIVATION OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES AND MONOCYTES BY COMPONENTS OF PROTEOBACTERIA PSEUDOALTEROMONAS NIGRIFACIENS

T.P. Smolina¹, T.S. Zaporozhets¹, R.P. Gorshkova², E.L. Nazarenko²

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

² Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100-Anniversary Av. Vladivostok 690022 Russia)

Summary – Applying bicolour flow cytometry technique by FACS-Calibur (Becton Dickinson), the authors have determined effects produced by lipopolysaccharide derived from the sea proteobacteria *Pseudoalteromonas nigrifaciens* and its structural components on the early activation of human mononuclear blood cells. Lipopolysaccharide, O-specific polysaccharide (O-PS) and oligosaccharide cor (Cor) increased the CD69 and CD25 expression on the CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ lymphocytes and on the CD69 expression monocytes. Lipopolysaccharide increased CD95 expression on the CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺ cells; O-PS and Cor increased the CD4⁺ expression. None of the glycopolymers under study induced statistically significant changes in the CD38 expression. Compared to the polysaccharide, O-PS and Cor caused more intense increase of activation marker expression on the monocytes and lymphocytes. To a greater extent, O-PS and Cor activated cells capable of producing cytotoxic effect.

Key words: lipopolysaccharide, polysaccharide, sea bacteria, lymphocyte activation.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 45–48.