

УДК [616.831-002-022:578.833]-085.322:582.272:577.114

*И.Д. Макаренко<sup>1</sup>, Н.В. Крылова<sup>1</sup>, Г.Н. Леонова<sup>1</sup>, Н.Н. Беседнова<sup>1</sup>, Т.Н. Звягинцева<sup>2</sup>, Н.М. Шевченко<sup>2</sup>*

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

## **ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ФУКОИДАНА ИЗ МОРСКОЙ БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ *LAMINARIA JAPONICA* ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КЛЕЩЕВОМ ЭНЦЕФАЛИТЕ**

*Ключевые слова:* вирус, клещевой энцефалит, фукоидан, протективное действие, выживаемость.

Проведено исследование протективного действия сульфатированного полисахарида – фукоидана из морской бурой водоросли *Laminaria japonica* при инфицировании мышей высокопатогенным штаммом вируса клещевого энцефалита *in vivo*. Установлено, что эффективность действия препарата зависит от дозы, кратности введения и способствует формированию защиты у зараженных животных. Широкий биологический спектр действия сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей, низкая токсичность и экологически чистые технологии производства открывают перспективу применения фукоиданов для профилактики и лечения вирусных инфекций.

Среди природно-очаговых вирусных нейроинфекций клещевой энцефалит (КЭ) до настоящего времени является актуальной проблемой для здравоохранения в связи с эпидемической значимостью и широким распространением на территории Российской Федерации [3]. Способность вируса КЭ длительное время сохраняться в активном состоянии в клетках центральной нервной системы даже после адекватного лечения острых форм заболевания и опасность перехода инфекционного процесса в прогрессивную форму обосновывают необходимость поиска новых противовирусных препаратов, обладающих лечебным и профилактическим действием. Большой интерес в этом направлении представляют сульфатированные полисахариды – фукоиданы из морских бурых водорослей, обладающие иммуномодулирующим, противовоспалительным, противовирусным, антиадгезивным, антикоагулянтным и противоопухолевым действием [2, 5, 7, 8, 11]. Согласно данным литературы, фукоиданы обладают выраженной активностью в отношении вирусов иммунодефицита человека, простого герпеса 1-го и 2-го типов, везикулярного стоматита, цитомегаловируса, хантавируса [4, 9, 12, 13]. Установлено, что противовирусное действие фукоиданов зависит от метода экстрагирования, структуры, молекулярной массы, степени сульфатирования и моносахаридного состава [5, 9, 11].

Целью настоящего исследования был анализ протективного действия фукоидана из морской бурой водоросли *Laminaria japonica* при экспериментальном КЭ у мышей.

**Материал и методы.** Выделение, изучение химического состава и структуры фукоидана проведено в Тихоокеанском институте биоорганической химии

ДВО РАН [14]. Фукоидан, выделенный из бурой водоросли *Laminaria japonica* (молекулярная масса 10–30 кДа), является  $\alpha$ -L-фуканом, сульфатированным в основном по C-4 остаткам фукозы, и отличается высоким содержанием галактозы. Моносахаридный состав представлен галактозой, маннозой, ксилозой и глюкозой в соотношении 65:20:8:4:3.

В эксперименте использовали вирус КЭ дальневосточного субтипа, штамм Р-73, выделенный из мозга человека, умершего от очаговой формы инфекции. Неинбредных мышей-самцов массой 14–16 г (по 20 в группе) инфицировали подкожно однократно в дозе 10 LD<sub>50</sub>/0,2 мл (инфекционный титр вируса 7,5 lg LD<sub>50</sub>/0,2 мл). При профилактической схеме вводили различные дозы фукоидана из *L. japonica* за 24 часа до заражения. При лечебной схеме инфицированным животным вводили фукоидан через 1 час после заражения. Под наблюдением в течение 21 дня находились следующие группы животных:

1-я группа: контроль (зараженные мыши, не получавшие препарат);

2-я группа: мыши, которым вводили фукоидан однократно или ежедневно в течение 5 дней внутрибрюшинно в дозе 100 и 400 мкг на особь за 24 часа до заражения;

3-я группа: мыши, получавшие фукоидан однократно или ежедневно в течение 5 дней внутримышечно в дозе 100 и 400 мкг на особь за 24 часа до заражения;

4-я группа: мыши, которым вводили фукоидан ежедневно в течение 5 дней внутрибрюшинно в дозе 100 и 400 мкг на особь через 1 час после заражения;

5-я группа: мыши, получавшие фукоидан однократно или ежедневно в течение 5 дней внутримышечно в дозе 100 и 400 мкг на особь через 1 час после заражения.

Проводили визуальное наблюдение за животными. Признаками заболевания считали вялость, ограничение подвижности, взъерошенность шерсти, отсутствие аппетита, парезы и параличи конечностей. В каждой группе рассчитывали показатели летальности на каждый день наблюдения. Результаты оценивали по защите, выживаемости и средней продолжительности жизни (СПЖ) животных. Мыши содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных. Мышей выводили из опыта эфирным наркозом. Экспериментальные исследования проведены с разрешения комитета по биомедицинской этике НИИЭМ СО РАМН.

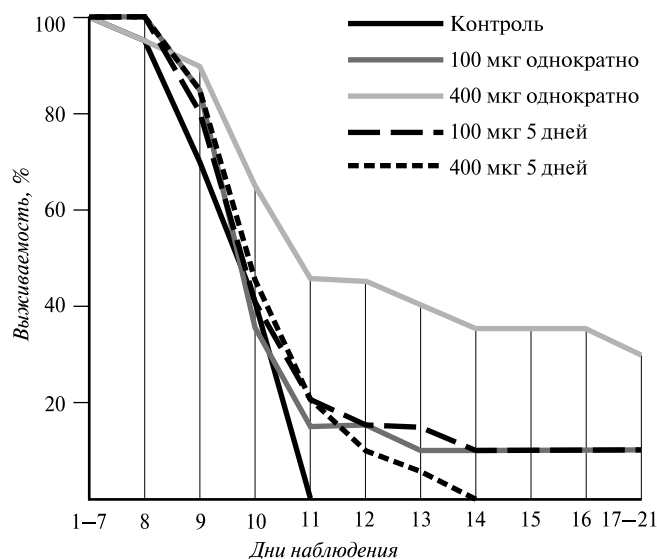


Рис. 1. Эффективность действия фукоидана из *L. japonica* на выживаемость мышей, инфицированных вирусом КЭ при внутрибрюшинном введении (профилактическая схема).

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием программ GeoStat и Biostatistics 4.03.

**Результаты исследования.** Летальность мышей в контрольной группе составила 100% на 11-й день наблюдения, СПЖ –  $9,98 \pm 0,38$  дня. Наибольший протективный эффект зарегистрирован при профилактическом однократном внутрибрюшинном введении препарата в дозе 400 мкг (2-я группа). Данная доза и способ введения обеспечивали защиту  $45 \pm 5\%$  животных на 11–13-й день. К 21-му дню выживаемость мышей в этой группе составила  $30 \pm 10\%$  при СПЖ  $12,62 \pm 0,63$  дня. Следует отметить, что протективный эффект фукоидана наблюдался на протяжении всего срока эксперимента, а СПЖ увеличивалась до 26,65% (рис. 1).

При профилактическом внутримышечном введении (3-я группа) наибольшее протективное действие зарегистрировано при дозе 100 мкг на особь в течение всего срока наблюдения. Однократное применение фукоидана способствовало защите  $45 \pm 5\%$  животных на 11-й день и  $40 \pm 10\%$  – на 12-й день, а выживаемость в группе составила 20%, при СПЖ  $12,75 \pm 0,42$  дня с ее увеличением на 27,55%. При введении препарата в течение 5 дней были получены аналогичные результаты: к концу срока наблюдения выживаемость животных составила  $25 \pm 5\%$ , СПЖ –  $12,6 \pm 0,23$  дня с ее увеличением на 26,25%. Внутримышечное введение фукоидана в дозе 400 мкг на особь не оказывало защитного действия (рис. 2).

Исследование протективного действия при введении фукоидана через 1 час после заражения (лечебная схема) показало, что наиболее эффективно было внутрибрюшинное применение препарата в течение 5 дней в дозе 400 мкг на особь (4-я группа). На 11–12-й день выжило  $40 \pm 10\%$  животных. На 21-й

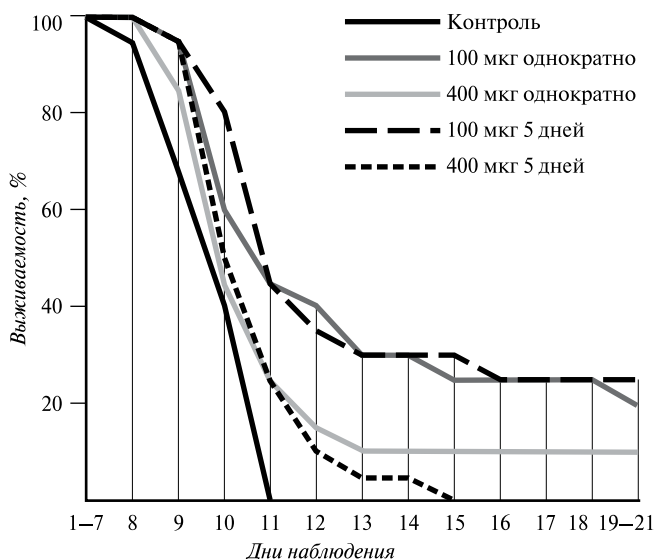


Рис. 2. Эффективность действия фукоидана из *L. japonica* на выживаемость мышей, инфицированных вирусом КЭ при внутримышечном введении (профилактическая схема).

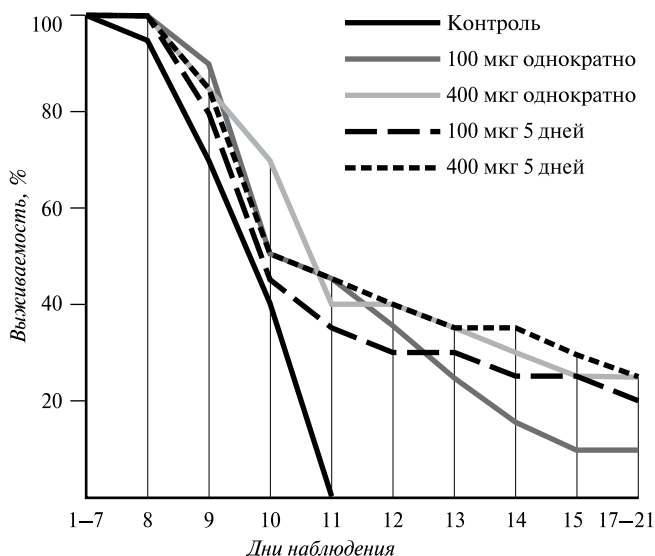


Рис. 3. Выживаемость мышей, инфицированных вирусом КЭ при внутримышечном введении фукоидана из *L. japonica* (лечебная схема).

день выживаемость в группе составила  $25 \pm 15\%$ , при СПЖ –  $12,44 \pm 1,31$  дня с ее увеличением на 24,64%.

Внутримышечное введение фукоидана через 1 час после заражения показало эффективность 5-дневного применения обеих доз препарата (100 и 400 мкг, 5-я группа). При дозе 100 мкг на особь выживаемость к концу срока наблюдения составила  $20 \pm 10\%$ , СПЖ –  $11,59 \pm 0,57$  дня при ее увеличении на 16,3%. Протективное действие фукоидана в дозе 400 мкг способствовало защите  $45 \pm 5\%$  животных на 11–12-й день. На 21-й день выживаемость равнялась  $25 \pm 5\%$ , СПЖ –  $12,14 \pm 0,11$  дня при ее увеличении на 21,64% (рис. 3).

**Обсуждение полученных данных.** Исследование протективного действия сульфатированного полисахарида – фукоидана из морской бурой водоросли

*L. japonica* при инфицировании мышей высокопатогенным штаммом вируса клещевого энцефалита показало, что он способствует защите мышей, инфицированных этим вирусом на 11–13-е сутки при 100% гибели животных в контроле. При этом эффективность действия препарата зависела от дозы, кратности и схемы введения.

Исследования В. Mytar [10] и Т.С. Запорожец [2] показали, что в механизме иммуномодулирующей активности сульфатированных полисахаридов особая роль принадлежит их способности индуцировать синтез и секрецию провоспалительных цитокинов клетками моноцитарно-макрофагального ряда. Это способствует экспрессии молекул адгезии, активации нейтрофилов, макрофагов и НК-клеток, усилению фагоцитоза, пролиферации лимфоцитов и увеличению синтеза  $\gamma$ -интерферона НК-клетками, что обеспечивает их участие в антиинфекционной защите [2, 10]. Увеличение выживаемости животных, зараженных вирусом КЭ, при однократном введении фукоидана, по-видимому, обусловлено активацией факторов врожденного иммунитета и секрецией провоспалительных цитокинов. Формирование защиты против вируса при многократном введении полисахарида, на наш взгляд, связано с активацией гуморальных и клеточных факторов адаптивного иммунитета.

В свою очередь, противовирусная активность фукоиданов, по мнению ряда авторов [4, 9, 11, 13], может быть обусловлена ингибированием адсорбции и последующей репликации вирусов в клетках макроорганизма за счет их связывания с определенными мембранными молекулами на клеточной поверхности. Известно, что за адсорбцию вируса клещевого энцефалита, взаимодействие с рецепторами клеток и слияние вирусной и клеточной мембран отвечает экспонированный на поверхности вирионов гликопротеин Е [6]. Рецепторами для вируса клещевого энцефалита на поверхности клеток являются гликопротеины, гепарансульфаты и ламининсвязывающий белок.

Высказано предположение, что на поверхности гликопротеина Е вируса существует участок, который может взаимодействовать с разными типами рецепторов для ламинина: интегринами, сульфатированными полисахаридами, гликолипидами, а также неинтегриновыми мембранными протеинами, в состав которых входит ламининсвязывающий белок [6]. Это позволяет предположить, что сульфатированные полисахариды наряду с гепарансульфатами и ламининсвязывающим белком могут являться одними из ко-рецепторов для вируса клещевого энцефалита. Возможно, что в результате конкурентного лиганд-рецепторного взаимодействия происходит связывание фукоидана с гликопротеином вируса, что препятствует слиянию клеточной и вирусной мембран, ведет к ингибированию адсорбции вируса и способствует созданию защиты у инфицированных мышей.

Одним из важнейших требований к противовирусным препаратам является создание защиты и способность удлинять инкубационный период инфекционного процесса [1]. Результаты исследования показали, что фукоидан способствует увеличению СПЖ и выживаемости мышей, инфицированных вирусом КЭ.

Таким образом, полученные результаты показали, что фукоидан из бурой водоросли *L. japonica* обладает защитным действием на модели экспериментального клещевого энцефалита, которое наблюдается на протяжении всего эксперимента. Мы предполагаем, что протективное действие фукоидана может быть непосредственно связано как с его воздействием на факторы врожденного и адаптивного иммунитета, так и с противовирусной активностью, обусловленной конкурентным углеводспецифическим взаимодействием с мембранными рецепторами клеток-мишеней.

Широкий биологический спектр действия сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей, низкая токсичность и экологически чистые технологии производства открывают перспективы для дальнейшего исследования и применения фукоиданов для профилактики и лечения вирусных инфекций.

#### Литература

1. Грибенча С.В., Холмс Р.Д., Атауллаханов Р.И., Баринский И.Ф. Противовирусная активность пептидного иммуномодулятора «Гепон» в экспериментах на модели уличного вируса бешенства // *Вопросы вирусологии*. 2003. № 4. С. 40–44.
2. Запорожец Т.С. Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия биополимеров морских гидробионтов: дис. ... докт. мед. наук. г. Владивосток. 2006. 352 с.
3. *Клещевой энцефалит* / под ред. Г.Н. Леоновой, Л.М. Сомовой-Исачковой. Владивосток: Приморский полиграфкомбинат, 2002. 192 с.
4. Макаренкова И.Д., Компанец Г.Г., Беседнова Н.Н. и др. Ингибирующее действие фукоиданов на адсорбцию вируса Хантаан на модели перитонеальных макрофагов // *Вопр. вирусол.* 2008. № 3. С. 12–15.
5. Шевченко Н.М. Строение, биологическая активность полисахаридов некоторых бурых водорослей и продуктов их ферментативной трансформации: дис. ... канд. хим. наук. Владивосток. 2001. 93 с.
6. Романова Л.Ю., Гмыль Л.В. Локтев В.Б. и др. Изменение антигенной структуры поверхностного гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита при его адаптации к клещам и млекопитающим // *Вопросы вирусологии*. 2006. № 6. С. 31–34.
7. Berteau O., Mullou B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide // *Glycobiology*. 2003. Vol. 13, No. 6. P. 29–40.
8. 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.
9. 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.