

УДК 577.114.7;615.322;547.917

ВЛИЯНИЕ ФУКОИДАНОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ И ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 2015 Н.Ю. Анисимова¹, Н.Е. Устюжанина², Ф.В. Доненко¹,
М.И. Билан², Н.А. Ушакова³, А.И. Усов², Н.Э. Нифантьев²,
М.В. Киселевский^{1*}

¹ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина,
115478 Москва, Каширское шоссе, 24; факс: +7(499)324-2794,
электронная почта: kisele@inbox.ru

² Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН,
119991 Москва, Ленинский пр., 47; факс: +7(499)135-5328,
электронная почта: nep@ioc.ac.ru

³ Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,
119121 Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8;
факс: +7(495) 245-0857

Поступила в редакцию 26.12.14
После доработки 28.03.15

Проведено исследование иммуотропной активности структурно различных фукоиданов и их производных по отношению к изолированным иммунокомпетентным клеткам крови, являющихся эффекторами врожденного иммунного ответа. Наибольшую активность продемонстрировал высокомолекулярный фукоидан CF из водоросли *Chordaria flagelliformis*, основная цепь которого построена из (1→3)-связанных остатков α-L-фукопиранозы, а боковые заместители включают остатки α-D-глюкуроновой кислоты и α-L-фукофуранозы. Это соединение в концентрации 0,05 мг/мл стимулировало фагоцитоз *Saccharomyces cerevisiae* и *Lactobacillus acidophilus* нейтрофилами, увеличивая как относительное количество фагоцитов, так и их эффективность. При этом было отмечено возрастание концентрации мембраносвязанных молекул интегрина CD11c на 14%. Воздействие CF на системном уровне в дозе 0,01 мг/мышь внутрибрюшинно приводило к усилению противоопухолевой цитотоксической активности мононуклеарных лейкоцитов селезенки против клеток меланомы линии В16 в 1,9 раза и против клеток эритромиелобластного лейкоза линии К-562 в 1,7 раза. Полученные данные свидетельствуют о способности фукоидана CF стимулировать противоинфекционную и противоопухолевую активность эффекторов врожденного иммунитета при участии интегринов CD11c.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фукоиданы, лейкоциты, натуральные киллеры, фагоцитоз, цитотоксичность.

Сульфатированные полисахариды фукоиданы из бурых водорослей вызывают интерес благодаря проявляемой ими биологической активности, такой как антикоагулянтная, антитромботическая, противовоспалительная, противо-

опухолевая, противовирусная и др. [1–4]. На основе таких биомолекулярных систем [5], как фукоиданы, могут быть разработаны эффективные фармацевтические препараты для лечения целого ряда социально-значимых заболеваний. В настоящее время фукоиданы рассматриваются как один из наиболее перспективных классов природных соединений для разработки иммуномодулирующих агентов, поскольку они наряду с широким спектром иммуотропных свойств характеризуются относительно низкой токсичностью. Механизм иммуностимулирующего действия фукоиданов связывается, прежде всего, с их способностью активировать фагоциты и индуцировать продукцию цитокинов, таких как фактор некроза опухоли-α, интерлейкин-6 и интерлейкин-8 [1, 4, 6, 7]. Эти эффекты приво-

Принятые сокращения: НК – натуральные киллеры, SL – высокомолекулярный фукоидан из водоросли *Saccharina latissima*, CF – высокомолекулярный фукоидан из водоросли *Chordaria flagelliformis*, PpDX – дексилосилированный низкомолекулярный фукоидан из водоросли *Punctaria plantaginea*, OS – синтетический полностью сульфатированный октасахарид, ДМСО – диметилсульфоксид, ФИ – фагоцитарный индекс, ФЧ – фагоцитарное число, MFI – средняя интенсивность флуоресценции, НСТ – нитросиний тетразолий, КМ – клетки-мишени, МЛ – мононуклеарные лейкоциты, КЭ – клетки-эффекторы, ИЦА – индекс цитотоксической активности.

* Адресат для корреспонденции.

дят к стимуляции натуральных киллеров (НК), а также Т-клеток, что сопровождается повышением их цитотоксической активности по отношению к трансформированным клеткам, а также высвобождением интерферона- γ и интерлейкина-12. Кроме того, фукоиданы способны вызывать активацию и созревание антигенпрезентирующих дендритных клеток [8].

Фукоиданы, продуцируемые разными видами водорослей, существенно различаются строением и спектром биологической активности [9–12]. Целью настоящего исследования являлась оценка воздействия структурно различных фукоиданов и их производных на активность иммунокомпетентных клеток крови, являю-

щихся эффекторами врожденного иммунного ответа. Были изучены два высокомолекулярных фукоидана из водорослей *Saccharina latissima* SL [13] и *Chordaria flagelliformis* CF [14], дексильозинированный низкомолекулярный фукоидан PPdX [15] из водоросли *Punctaria plantaginea* и синтетический полностью сульфатированный октасакхарид OS [16]. Основные структурные характеристики исследованных сахаридов представлены на рис. 1, а содержание моносахаридов и сульфата указано в табл. 1. В качестве биообъектов были выбраны натуральные киллеры и нейтрофилы, которые проявляют противоопухолевую и противоионфекционную активность соответственно.

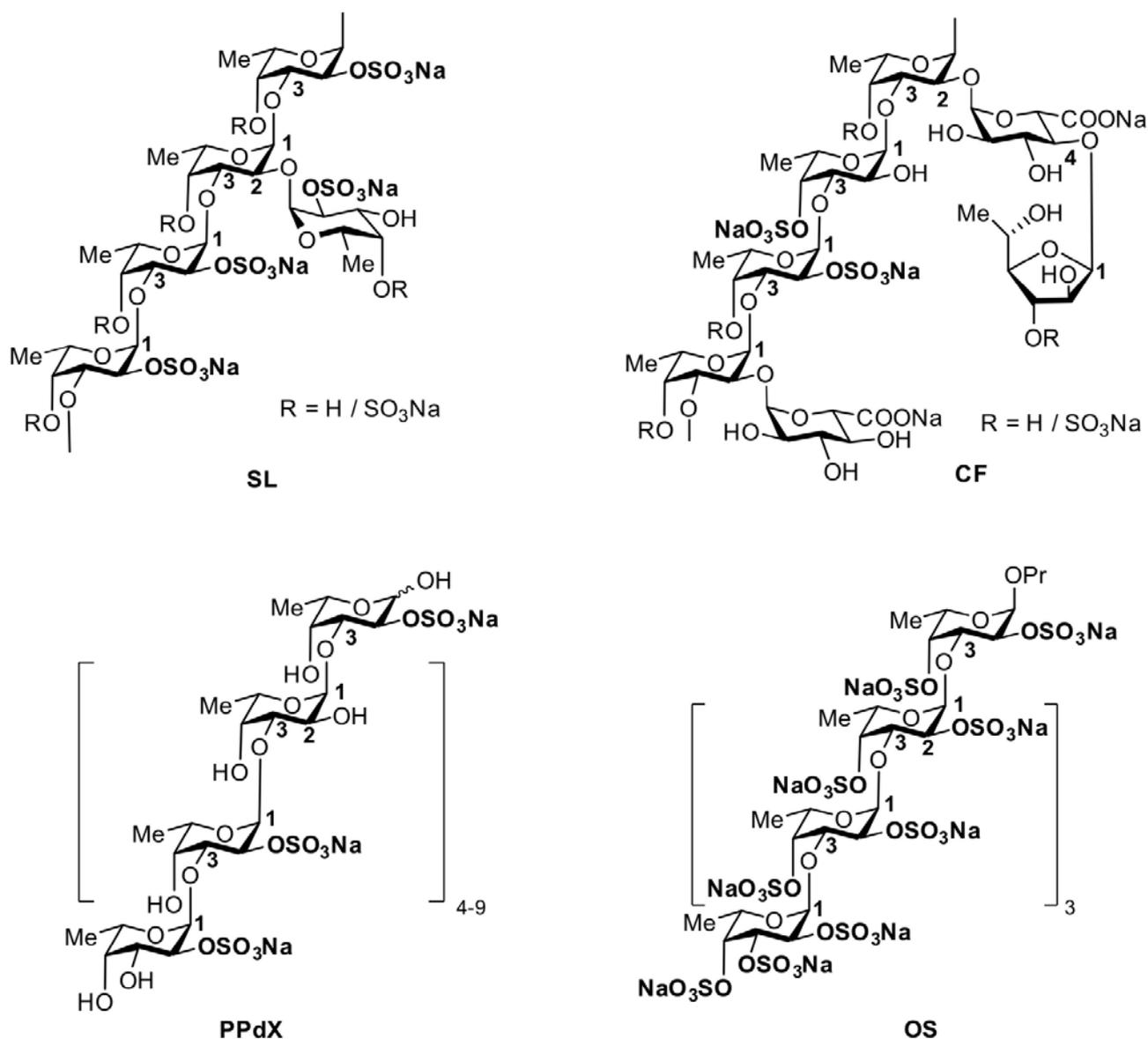


Рис. 1. Основные структурные характеристики исследованных фукоиданов и их производных

Таблица 1. Состав^а исследованных поли- и олигосахаридов

Образец	Источник	Fuc	Xyl	Man	Gal	UA ^б	SO ⁻² / ₃	DS ^в
CF [14]	<i>C. flagelliformis</i>	40,1	—	—	1,7	13,5	26,6	0,8
SL [13]	<i>S. latissima</i>	36,7	1,8	0,7	8,4	1,9	39,8	1,3
PPdX [15]	расщепление по Смиту фукоидана из <i>P. plantaginea</i>	60,2	—	—	1,5	—	27,4	0,7
OS [16]	синтез из L-фукозы	39,4	—	—	—	—	59,1	2,0

^а Содержание (w/w, %) моносахаридов и сульфата.

^б Уроновые кислоты.

^в Степень сульфатирования рассчитана как молярное отношение сульфата к сумме моносахаридов (Fuc + Xyl + Gal + UA).

Ранее нами было проведено исследование антикоагулянтной, противовоспалительной и антиангиогенной активностей для ряда структурно различных фукоиданов [9]. Интервал активных концентраций полисахаридов составил 10–100 мкг/мл, в связи с этим в настоящем исследовании мы использовали схожие количества сахаридов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованные поли- и олигосахариды. Высокомолекулярные фукоиданы из водорослей видов *S. latissima* SL и *C. flagelliformis* CF выделяли, как описано ранее [13, 14]. Полисахарид PPdX получали дексилосилированием нативного фукоидана из водоросли вида *P. plantaginea* [15]. Полностью сульфатированный октасахарид OS синтезировали из L-фукозы [16]. Содержание моносахаридов и сульфата в исследованных сахарадах указано в табл. 1. Для приготовления рабочих (стоковых) растворов навески поли- и олигосахаридов (5,0 мг) были растворены сначала в диметилсульфоксиде (ДМСО) (1 мл), а затем в стерильном 0,9%-ном растворе хлорида натрия (9 мл).

Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов. Для исследований использовали кровь клинически здоровых доноров, стабилизированную гепарином (20 ед/мл) или 3,8%-ным цитратом натрия в соотношении 9 : 1. Кровь (0,9 мл) в течение 3 ч инкубировали с растворами исследуемых образцов (0,1 мл) при 37° на возвратнопоступательном шейкере при 250 об/мин. Конечная концентрация образцов сульфатированных сахаридов составляла 0,05 мг/мл. В контрольной серии экспериментов к стабилизированной крови (0,9 мл) добавляли 0,9%-ный

раствор NaCl (0,1 мл), содержащий 10%-ный ДМСО.

Для изучения фагоцитоза с помощью световой микроскопии в качестве объектов фагоцитоза использовали суспензии *Saccharomyces cerevisiae* (дрожжи вида *S. cerevisiae*) и *Lactobacillus acidophilus* (штамм бактерий *L. acidophilus* N.V. EP 317/402 «Наринэ» ТНСи), которые инкубировали с престоимированной фукоиданами кровью в течение 45 мин [17]. Готовили мазок, окрашивали его по Романовскому–Гимзе и проводили микроскопию с масляной иммерсией. В каждом мазке подсчитывали не менее 100 нейтрофилов, вычисляя фагоцитарный индекс (ФИ) – процент клеток, содержащих фагоцитированные объекты, а также фагоцитарное число (ФЧ) – количество поглощенных одним фагоцитом бактерий или дрожжей [18].

Исследование фагоцитарной активности нейтрофилов крови за счет кислородзависимого киллинга *E. coli* проводили с использованием набора реагентов FagoFlowEx Kit («EXBIO Diagnostics», Чехия) методом проточной цитометрии. Популяцию нейтрофильных лейкоцитов выделяли при помощи гейтирования по параметрам малоуглового и бокового светорассеяния. Результаты регистрировали на канале флуоресценции FL1 (FITC) цитофлуориметра BD Canto II («Becton Dickinson», США). Затем в соответствии с инструкцией производителя проводили оценку средней интенсивности флуоресценции (MFI – от англ. mean fluorescence intensity, усл. ед) фагоцитов, которая отражает уровень активации отдельного нейтрофила.

Для изучения активации кислородзависимых механизмов фагоцитоза использовали спектрофотометрический вариант теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ). Принцип метода основан на учете количества диформаза,

восстановленного фагоцитами из НСТ. Эта химическая реакция осуществляется благодаря активации кислородзависимой биоцидности фагоцитов. НСТ-тест проводили в двух вариантах: спонтанном и стимулированном [18]. В качестве стимулятора использовали суспензию дрожжей *S. cerevisiae* и кислотолюбных бактерий *L. acidophilus*. Кровь в течение 3 ч инкубировали с растворами исследуемых фукоиданов при 37° на возвратно-поступательном шейкере при 200 об/мин, а затем еще 1,5 ч с микроорганизмами в тех же условиях. Концентрация образца сульфатированного сахара составляла 0,05 мг/мл. Затем добавляли раствор НСТ и инкубировали еще 45 мин. Результат учитывали, измеряя оптическую плотность раствора на планшетном сканере MS Multiscan («Multiscan», Финляндия) при 540 нм.

Определение концентрации лейкоцитов с фенотипом CD45+CD66b+CD11c+. Использовали антитела к CD45, CD11c, CD66b человека, конъюгированные с флуорохромами («Becton Dickinson», США). После инкубации крови с антителами эритроциты лизировали реагентом OptiLyse («Immunotech», Франция), затем клетки отмывали фосфатно-солевым буфером. Фенотип лейкоцитов оценивали методом проточной цитометрии на цитофлуориметре BD Canto II («Becton Dickinson», США). В каждом образце анализировали не менее 10 000 клеток. Популяцию нейтрофилов последовательно гейтировали по параметрам малоуглового и бокового светорассеяния, а затем выделяли клетки CD45+. Результаты выражали в виде доли флуоресцирующих клеток в процентах от общего числа клеток, а также в виде величины MFI – интенсивности флуоресценции отдельной клетки по целевому маркеру. Анализ результатов проводили в программе FACSDiva 6.1.3.

Оценка цитотоксической активности лейкоцитов *ex vivo*. 20 мышей линии C57Bl/6 были разделены на две равные группы – опытную и контрольную. Раствор CF вводили мышам опытной группы в дозе 0,01 мг/мышь внутривенно пятикратно один раз в сутки ежедневно (первое введение – за 24 ч до перевивки опухоли). Мышам обеих групп прививали опухоль меланомы B16 (500 000 клеток на мышь). По истечении 20 сут у мышей был произведен забор селезенок в стерильных условиях. Из гомогената селезенок на градиенте плотности фикола-урографина выделяли мононуклеарные лейкоциты (МЛ), которые дважды отмывали центрифугированием в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия). В качестве клеток-мишеней (КМ) использовали клетки НК-чувствительной линии эритробластного лейкоза К-562 и клетки меланомы линии B16 (банк клеточных линий РОНЦ им. Н.Н. Блохи-

на). Подсчитывали количество живых эффекторных и опухолевых клеток в суспензиях при добавлении трипанового синего («Sigma», США). Для коинкубации клеток с тестируемыми веществами использовали 96-луночные планшеты («Nunc», США или «Costar», Франция). Концентрация клеток-мишеней в среде составляла 500 000 кл/мл. Соотношение клеток-мишеней и клеток-эффекторов МЛ (КЭ) в среде соответствовало 1/2, 1/5 и 1/10. После коинкубации в течение 24 ч определяли индекс цитотоксической активности (ИЦА) натуральных киллеров с помощью колориметрического МТТ-теста, основанного на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметил-2-тиазил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ) до фиолетовых кристаллов формазана, растворимых в ДМСО [19].

Статистический анализ первичных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0, StatSoft. Результат анализа представлен в формате: среднее выборочное (χ) \pm величина стандартной девиации (SD). Для расчета величины достоверности отличия от контроля (p) применяли t -критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основная цепь исследованных углеводных молекул построена из повторяющихся (1→3)-связанных остатков α -L-фукопиранозы. Образцы SL и CF представляют собой высокомолекулярные полимеры, содержащие боковые заместители, состоящие из остатков α -L-фукопиранозы (SL), α -D-глюкуроновой кислоты (CF) и α -L-фукофуранозы (CF). Степень сульфатирования (отношение содержания сульфата к моносахаридам) для полисахаридов SL и CF составила 1,3 и 0,8 соответственно. Образец PPdX – линейный низкомолекулярный полисахарид со степенью сульфатирования 0,7. Соединение OS – синтетический низкомолекулярный октасахарид со степенью сульфатирования 2,0.

В табл. 2 приведены результаты исследования воздействия соединений CF, SL, PPdX и OS в концентрации 0,05 мг/мл на активацию захвата молочнокислых бактерий *L. acidophilus* и дрожжей *S. cerevisiae* сегментоядерными нейтрофилами крови, стабилизированной гепарином.

Приведенные в табл. 2 данные указывают на усиление поглощения нейтрофилами *L. acidophilus* после стимуляции высокомолекулярными полисахаридами CF и SL. При этом наблюдали как увеличение относительного количества фагоцитов (в сравнении с контролем ФИ было вы-

Таблица 2. Фагоцитарный индекс (ФИ) и фагоцитарное число (ФЧ) лейкоцитов крови человека после стимуляции сульфатированными сахарами CF, SL, PPdX и OS в сравнении с контролем

Образцы	Микроорганизмы							
	<i>L. acidophilus</i>				<i>S. cerevisiae</i>			
	ФИ, %	<i>p</i>	ФЧ, ед	<i>p</i>	ФИ, %	<i>p</i>	ФЧ, ед	<i>p</i>
CF	69 ± 5,7	0,006	4 ± 0,7	0,044	79 ± 6,1	0,007	8 ± 3,3	0,002
SL	65 ± 1,1	0,001	5 ± 3,2	0,047	63 ± 6,0	0,133	4 ± 1,5	0,500
PPdX	39 ± 2,4	0,473	1 ± 3,5	0,588	НО	–	НО	–
OS	47 ± 10,0	0,105	2 ± 1,3	0,071	НО	–	НО	–
Контроль	38 ± 3,1		3 ± 1,6		56 ± 7,2		4 ± 2,1	

Примечание. НО – не определено.

ше в 1,8 и 1,7 раз соответственно), так и тенденцию увеличения ФЧ после преинкубации с этими соединениями. Также эти соединения способствовали увеличению ФИ относительно дрожжей на 23% ($p < 0,05$) и 7% ($p > 0,05$) соответственно. При этом после стимуляции нейтрофилов CF ФЧ увеличилось относительно контроля в 2 раза (рис. 2, см. цветную вклейку). Низкомолекулярные сахара PPdX и OS были неактивны в данном тесте.

Сходные данные были получены в результате исследования кислородзависимого киллинга *E. coli* после преинкубации клеток крови, стабилизированной гепарином, с образцами сульфатированных сахаридов методом проточной цитометрии (табл. 3). Было показано достоверное повышение антибактериальной фагоцитарной активности нейтрофилов крови после их предварительной стимуляции с образцом CF. Однако если после стимуляции CF величина MFI фагоцитирующих нейтрофилов увеличилась на 9%, то после стимуляции PPdX и OS она уменьшилась – в 1,8 и 1,5 раза соответственно ($p < 0,05$).

Известно, что кислородзависимая биоцидность фагоцитов опосредована, в т.ч. и активными метаболитами кислорода, образуемыми в процессе так называемого «респираторного взрыва». Поэтому количественное изучение данного показателя после преинкубации клеток крови с сульфатированными сахарами проводили с помощью НСТ-теста: спонтанного и стимулированного *S. cerevisiae* и *L. acidophilus*. Результаты экспериментов представлены в табл. 4 и 5.

Приведенные в табл. 4 данные указывают на то, что предварительная стимуляция клеток гепаринизированной крови CF в наибольшей степени способствовала нарастанию кислородза-

висимой фагоцитарной активности фагоцитов при контакте как с дрожжами, так и с бактериями *in vitro*. Другие образцы практически не влияли на активность лейкоцитов в НСТ-тесте. Аналогичные результаты были получены при исследовании образцов крови, стабилизированной цитратом натрия (табл. 5).

Для изучения механизмов усиления фагоцитарной активности нейтрофилов под воздействием CF был исследован фенотип нейтрофилов крови, стабилизированной гепарином, после коинкубации с фукоиданом. В частности, оценивали изменение относительной концентрации CD45+CD66b+CD11c+ клеток.

По результатам проведенных исследований было установлено, что после 4 ч коинкубации лейкоцитов крови человека с CF в концентрации 0,05 мг/мл наблюдалось достоверное увеличение относительной концентрации

Таблица 3. Влияние образцов CF, SL, PPdX и OS на кислородзависимую биоцидность фагоцитов *E. coli* нейтрофилами крови здорового донора

Стимуляторы фагоцитоза	MFI	<i>p</i>
CF	5,61 ± 3,11	0,028
SL	1,142 ± 78,4	0,403
PPdX	2,93 ± 1,51	0,001
OS	3,46 ± 1,53	0,001
Контроль	5,15 ± 1,2	–

Таблица 4. Изменение активности лейкоцитов в НСТ-тесте под воздействием образцов CF, SL, PPdX и OS (кровь, стабилизированная гепарином)

Образцы	Оптическая плотность раствора формазана			Стимулированная/спонтанная активность	
	спонтанная активность	стимулированная активность		дрожжи	бактерии
		дрожжи	бактерии		
CF	2359 ± 708	3129 ± 939	2999 ± 900	1,33	1,27
SL	3274 ± 982	2900 ± 870	3200 ± 960	0,89	0,98
PPdX	2922 ± 877	3148 ± 944	3105 ± 932	1,08	1,06
OS	3132 ± 940	3375 ± 1013	3112 ± 934	1,08	0,99
Контроль	2733 ± 850	2942 ± 883	2845 ± 854	1,08	1,04

Таблица 5. Изменение активности лейкоцитов в НСТ-тесте под воздействием образцов CF, SL, PPdX и OS (кровь, стабилизированная цитратом натрия)

Образцы	Оптическая плотность раствора формазана			Стимулированная/спонтанная активность	
	спонтанная активность	стимулированная активность		дрожжи	бактерии
		дрожжи	бактерии		
CF	2865 ± 657	3338 ± 784	3317 ± 854	1,17	1,16
SL	2959 ± 885	2833 ± 708	2982 ± 215	0,96	1,01
PPdX	2984 ± 947	3352 ± 842	3233 ± 340	1,12	1,08
OS	2997 ± 588	3404 ± 684	3399 ± 691	1,14	1,13
Контроль	2902 ± 651	3019 ± 807	2996 ± 590	1,04	1,03

CD45+CD66b+CD11c+ лейкоцитов с $72 \pm 1,1\%$ в контроле до $86 \pm 1,7\%$ в пробе с этим фукоиданом, $p < 0,001$; показатель MFI нарастал с 390 ± 298 до 586 ± 175 усл. ед соответственно, $p < 0,001$ (рис. 3, см. цветную вклейку).

Полученные данные указывают на то, что повышение на мембране нейтрофилов концентрации интегрина CD11c, опосредованное воздействием CF, позитивно коррелирует с усилением захвата фагоцитами микроорганизмов. При этом не удалось достоверно установить факт усиления интенсивности кислородного взрыва в клетках-эффекторах, определяющих успешную деструкцию захваченного фагоцитом объекта.

Для оценки воздействия наиболее активного фукоидана CF на функциональность эффекторов врожденного противоопухолевого иммуни-

тета проводили исследование изменения цитотоксической активности МЛ селезенки мышей после курса парентерального введения CF. Изменение противоопухолевой цитотоксической активности МЛ изучали в сравнении с контролем. В качестве клеток-мишеней (КМ) использовали клетки НК-чувствительной линии эритробластного лейкоза К-562 и клетки меланомы линии В16. Соотношение клеток-мишеней и клеток-эффекторов МЛ (КЭ) в среде соответствовало 1/2, 1/5 и 1/10. Результаты представлены в табл. 6.

Приведенные в табл. 6 данные указывают на то, что системное воздействие CF на иммунитет мышей реализуется усилением противоопухолевой активности иммунокомпетентных клеток. При этом наблюдается не только тенденция усиления НК-активности по отношению к НК-

Таблица 6. Цитотоксическая активность спленоцитов животных после системного введения фукоидана CF (опытная группа) в сравнении с контролем

Клетки-мишени (КМ)	Соотношение КМ/КЭ	ИЦА, %		
		контроль	опыт	<i>p</i>
K-562	1/2	9 ± 11,9	15 ± 17,0	0,321
	1/5	32 ± 14,8	53 ± 15,7	0,084
	1/10	60 ± 21,3	72 ± 10,8	0,217
B16	1/2	8 ± 4,7	15 ± 2,7	0,045
	1/5	22 ± 11,3	24 ± 4,6	0,395
	1/10	24 ± 4,7	41 ± 4,7	0,006

чувствительной линии K-562 (в сравнении с контролем ИЦА МЛ увеличился в 1,2–1,7 раза), но и статистически достоверное усиление цитотоксичности, направленной против клеток меланомы линии B16 (в сравнении с контролем ИЦА МЛ увеличился в 1,7–1,9 раза).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований было показано, что строение фукоиданов существенно влияет на их иммуотропные свойства. Наибольшую активность продемонстрировал высокомолекулярный фукоидан CF из водоросли *C. flagelliformis*, основная цепь которого построена из (1→3)-связанных остатков α-L-фукопиранозы, а боковые заместители включают остатки α-D-глюкуроновой кислоты и α-L-фукофуранозы. Умеренную активность проявлял высокомолекулярный фукоидан SL, содержащий в качестве боковых заместителей остатки α-L-фукопиранозы. Низкомолекулярные линейные сахара PPdX и OS были практически неактивны.

После коинкубации лейкоцитов крови человека с фукоиданом CF было установлено увеличение на 14% относительного количества интегрин CD11c на фоне нарастания показателя MFI с 390 ± 298 до 586 ± 175 усл. ед, $p < 0,001$. Как известно, интегрин CD11c является гликопротеином из надсемейства интегринов, α-субъединицей интегрин αXβ2, рецептора фибриногена. Одно из ранее описанных свойств CD11c – это способность опосредовать фагоцитоз iC3b-опсонизированных частиц [20]. Также эта молекула является рецептором комплемента C4. CD11c вовлечен в фагоцитоз частиц латекса и бактерий в отсутствие комплемента, клеточную миграцию, продукцию цитокинов моноцитами

и макрофагами, способен связывать множество лигандов, вовлеченных в клеточную адгезию, таких как ICAM-1 и ICAM-4, а также ЛПС [21]. Это дало основания ряду специалистов рассматривать повышение концентрации CD11c+ иммунных клеток в крови как маркер усиления их функциональной активности. В частности, ранее нами были получены аналогичные результаты, подтверждающие положительную корреляцию нарастания уровня интегринов и высокой фагоцитарной активности эффекторов врожденного иммунитета [22, 23]. В настоящем исследовании эта закономерность была подтверждена в специальных сериях опытов по оценке захвата бактерий (*L. acidophilus* и *E. coli*) и дрожжей, при этом результаты учитывали как с помощью световой микроскопии, так и с использованием метода проточной цитометрии. В частности, после инкубации клеток крови с CF наряду с повышением содержания CD11c+ нейтрофилов и уровня экспрессии на клеточной мембране данного маркера увеличивается ФИ поглощения *L. acidophilus* и дрожжей в 1,8 и 1,4 раза ($p < 0,05$) соответственно. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об усилении под воздействием фукоидана CF начальной стадии фагоцитоза – поглотительной способности нейтрофилов. В качестве стабилизатора крови использовали гепарин, в специальной серии опытов было установлено, что замена гепарина на цитрат натрия не изменяет ответную реакцию клеток на воздействие фукоиданов.

Завершающая фаза фагоцитоза связана с деструкцией биологических агентов, имеющих корпускулярную структуру (бактериальные и грибковые патогены, клетки простейших, собственные поврежденные клетки и продукты их распада), посредством кислородзависимых и кислороднезависимых механизмов. При этом

для элиминации микроорганизмов важную роль играет кислородзависимая биоцидность фагоцитов (кислородный взрыв), опосредованный активацией НАДФН-оксидазы, которая катализирует восстановление молекулярного кислорода до супероксидного радикала, что приводит к появлению в фагоците активных форм кислорода (супероксид-анион-радикал, перекись водорода, радикал гидроперекиси и др.). В данной работе с использованием НСТ-теста было показано умеренное увеличение под влиянием фукоидана СФ показателей, характеризующих интенсивность кислородного взрыва, что свидетельствует о способности полисахарида незначительно усиливать деструкцию фагоцитированных микроорганизмов.

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что фукоидан СФ существенно усиливает поглощение нейтрофилами бактерий и дрожжей (начальная стадия фагоцитоза), но не реализацию деструкции фагоцитированных микроорганизмов, опосредованной кислородзависимыми механизмами (завершение фагоцитоза). Выявленная особенность действия полисахарида на нейтрофилы может рассматриваться как сбалансированное стимулирующее влияние на клеточное звено противоинфекционного иммунитета, исключающее избыточное выделение реактивных кислородных радикалов, вызывающих острое повреждение тканей с развитием органной и даже полиорганной недостаточности [24, 25].

Проведенные нами исследования также позволили установить усиление проявления цитотоксической противоопухолевой активности иммунокомпетентных клеток в условиях *ex vivo* после курсового парентерального введения СФ. Целью данного эксперимента было изучение влияния фукоиданов на иммунореактивность мышей-опухоленосителей для определения изменений функционального состояния эффекторов врожденного иммунитета — натуральных киллеров, участвующих в реализации противоопухолевого иммунитета. Выбранный дизайн исследования позволил, с одной стороны, оценить НК-активность, являющуюся интегральным показателем реактивности эффекторов врожденного иммунитета, а с другой — определить противоопухолевую цитотоксическую активность лимфоцитов по отношению к клеткам целевой (привитой мышам) опухоли — меланомы В16. Поэтому в качестве клеток-мишеней в

цитотоксическом тесте были использованы две клеточные линии: НК-чувствительная линия клеток К-562 и клетки штамма меланомы В16. В итоге после курса фукоидана наблюдали не только тенденцию к стимуляции НК-активности при испытании на НК-чувствительной линии клеток К-562 (в сравнении с контролем ИЦА МЛ увеличился в 1,2–1,7 раза), но и статистически достоверное усиление цитотоксичности против клеток меланомы линии В16 (в сравнении с контролем ИЦА МЛ увеличился в 1,1–1,9 раза). Известно, что интегрин CD11c ассоциированы в качестве мембраносвязанной молекулы не только с нейтрофилами, но также и с моноцитами, тканевыми макрофагами, НК и дендритными клетками. Возможно, что обнаруженная нами способность СФ стимулировать противоопухолевую эффективность МЛ, как и в случае с нейтрофилами, опосредована усилением экспрессии мембраносвязанных молекул CD11c на НК, обеспечивающих контакт эффекторов с клетками-мишенями.

Полученные данные позволяют предположить, что молекулярный механизм стимулирующего действия фукоидана СФ на эффекторы противоинфекционного и противоопухолевого иммунитета реализуется при участии интегрин CD11c.

Проведенное в данной работе исследование позволило установить, что фукоидан СФ из водоросли *C. flagelliformis* способен активировать клетки врожденного иммунитета как при локальном воздействии *in vitro*, так и на системном уровне при курсовом парентеральном введении. Было достоверно установлено, что это соединение интенсифицирует захват микроорганизмов нейтрофилами, увеличивая как относительное количество фагоцитов (ФИ), так и их эффективность (ФЧ), на фоне возрастания концентрации молекул интегрин CD11c на мембране нейтрофилов. Воздействие СФ на системном уровне приводило к усилению противоопухолевой цитотоксической активности (ИЦА) МЛ селезенки против клеток меланомы линии В16 (в 1,7–1,9 раза, $p < 0,05$) и против клеток линии К-562 (в 1,2–1,7 раза, $p > 0,05$).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант КОМФИ 13-04-40315-К и составляющие его гранты 13-04-40313-Н, 13-04-314-Н и 13-04-40315-Н).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fitton, J.H. (2011) Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers, *Mar. Drugs*, **9**, 1731–1760.
- Pomin, V.H. (2012) Fucanomics and galactanomics: current status in drug discovery, mechanisms of action and role of the well-defined structures, *Biochim Biophys Acta*, **1820**, 1971–1979.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., and Ewart, S. (2011) Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae, *Mar. Drugs*, **9**, 196–223.
- Ale, M.T., Mikkelsen, J.D., and Meyer, A.S. (2011) Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds, *Mar. Drugs*, **9**, 2106–2130.
- Ananikov, V.P., Khokhlova, E.A., Egorov, M.P., Sakharov, A.M., Zlotin, S.G., Kuchеров, A.V., Kustov, L.M., Gening, M.L., and Nifantiev, N.E. (2015) Organic and hybrid molecular systems, *Mendeleev Commun.*, **25**, 75–82.
- Jin, J., and Yu, Q. (2015) Fucoidan delays apoptosis and induces pro-inflammatory cytokine production in human neutrophils, *Int. J. Biol. Macromol.*, **73**, 65–71.
- Макаренкова И.Д., Логунов Д.Ю., Тухватулин А.И., Семенова И.Б., Звягинцева Т.Н., Горбач В.И., Ермакова С.П., Беседнова Н.Н. (2012) Сульфатированные полисахариды бурых водорослей – лиганды толл-подобных рецепторов, *Биомед. хим.*, **58**, 318–325.
- Jin, J.-O., Zhang, W., Du, J.-Y., Wong, K.-W., Oda, T., and Yu, Q. (2014) Fucoidan can function as an adjuvant *in vivo* to enhance dendritic cell maturation and function and promote antigen-specific T-cell immune responses, *PLoS One*, **9**, e99396.
- Cumashi, A., Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M.E., D’Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G.E., Berman, A.E., Bilan, M.A., Usov, A.I., Ustuzhanina, N.E., Sanderson, C.J., Kelly, M., Rabinovich, G.A., Iacobelli, S., and Nifantiev, N.E. (2007) A comparative study of the antiinflammatory, anticoagulant, antiangiogenic and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds, *Glycobiology*, **17**, 541–552.
- Ustuzhanina, N.E., Ushakova, N.A., Zyuzina, K.A., Bilan, M.I., Elizarova, A.L., Somonova, O.V., Madzhuga, A.V., Krylov, V.B., Preobrazhenskaya, M.E., Usov, A.I., Kiselevskiy, M.V., and Nifantiev, N.E. (2013) Influence of fucoidans on hemostatic system, *Mar. Drugs*, **11**, 2444–2458.
- Ustuzhanina, N.E., Bilan, M.I., Ushakova, N.A., Usov, A.I., Kiselevskiy, M.V., and Nifantiev, N.E. (2014) Fucoidans: pro- or antiangiogenic agents, *Glycobiology*, **24**, 1265–1274.
- Ustuzhanina, N.E., Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M.E., Bilan, M.I., Tsvetkova, E.A., Krylov, V.B., Anisimova, N.A., Kiselevskiy, M.V., Krukovskaya, N.V., Li, C., Yu, G., Saran, S., Saxena, R.K., Usov, A.I., and Nifantiev, N.E. (2014) Fucoidans as a platform for new anticoagulant drugs discovery, *Pure Appl. Chem.*, **86**, 1365–1375.
- Bilan, M.I., Grachev, A.A., Shashkov, A.S., Kelly, M., Sanderson, C.J., Nifantiev, N.E., and Usov, A.I. (2010) Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*, *Carbohydr. Res.*, **345**, 2038–2047.
- Bilan, M.I., Vinogradova, E.V., Tsvetkova, E.A., Grachev, A.A., Shashkov, A.S., Nifantiev, N.E., and Usov, A.I. (2008) A sulfated glucuronofucan containing both fucopyranose and fucopyranose residues from the brown alga *Chordaria flagelliformis*, *Carbohydr. Res.*, **343**, 2605–2612.
- Bilan, M.I., Shashkov, A.S., and Usov, A.I. (2014) Structure of a sulfated xylofucan from the brown alga *Punctaria plantaginea*, *Carbohydr. Res.*, **393**, 1–8.
- Krylov, V.B., Kaskova, Z.M., Vinnitskiy, D.Z., Ustuzhanina, N.E., Grachev, A.A., Chizhov, A.O., and Nifantiev, N.E. (2011) Acid-promoted synthesis of per-O-sulfated fucooligosaccharides related to fucoidan fragments, *Carbohydr. Res.*, **346**, 540–550.
- Анисимова Н.Ю., Лебединская О.В., Карпенко А.Ю., Копылов А.Н., Киселевский М.В. (2012) Оценка активности нейтрофилов крови при использовании бактерий и одноклеточных дрожжей в качестве объектов фагоцитоза, *Вест. Урал. мед. акад. наук*, **41**, 12–13.
- Медицинские лабораторные технологии (2002) Справочник (под ред. Карпищенко А.И.), Интермедика, Санкт Петербург.
- Шпакова А.П., Павлова К.С., Булычева Т.И. (2000) МТТ-колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток, *Клинич. лаб. диагн.*, **2**, 20–23.
- Mann, B.S., and Chung, K.F. (2006) Blood neutrophil activation markers in severe asthma: lack of inhibition by prednisolone therapy, *Resp. Res.*, **7**, 59.
- Sadhu, C., Ting, H.J., Lipsky, B., Hensley, K., Garcia-Martinez, L.F., Simon, S.I., and Staunton, D.E. (2007) CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity, *J. Leukoc. Biol.*, **81**, 1395–1403.
- Анисимова Н.Ю., Плужникова Н.А., Громова Е.Г., Кузнецова Л.С., Цветков Д.С., Киселевский М.В. (2011) Рецептор апоптоза и молекул адгезии лейкоцитов – перспективные маркеры сепсиса у онкологических больных, *Российский иммунологический журнал*, **14**, 262–265.
- Anisimova, N.Yu., and Blokhin, N.N. (2014) *Immunological pathogenesis of sepsis and use of hemosorption for treatment of cancer patients with sepsis*, Nova Science Publishers Inc., N.Y.
- Kumar, V., and Sharma, A. (2010) Neutrophils: Cinderella of innate immune system, *Int. Immunopharmacol.*, **10**, 1325–1334.
- Thomas, S., and Balasubramanian, K.A. (2004) Role of intestine in postsurgical complications: involvement of free radicals, *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 745–756.

**INFLUENCE OF FUCOIDANS AND THEIR DERIVATIVES
ON ANTITUMOR AND PHAGOCYtic ACTIVITY
OF HUMAN BLOOD LEUCOCYTES**

**N. Yu. Anisimova¹, N. E. Ustyuzhanina², F. V. Donenko¹,
M. I. Bilan², N. A. Ushakova³, A. I. Usov², N. E. Nifantiev²,
M. V. Kiselevskiy^{1*}**

¹ *N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Kashirskoe shosse 24,
Moscow 115478, Russia; fax: +7(499)324-2794,
E-mail: kisele@inbox.ru*

² *N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Leninsky prosp. 47,
Moscow 119991, Russia; fax: +7(499)135-5328,
E-mail: nen@ioc.ac.ru*

³ *V. N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry,
ul. Pogodinskaya 10, Moscow 119121, Russia;
fax: +7(495) 245-0857*

Received December 26, 2014

Revision received March 28, 2015

The immunotropic activity of structurally different fucoidans and their derivatives towards isolated immune blood cells, effectors of innate immune system, was studied. The most potent effect was observed for high molecular weight fucoidan CF from alga *C. flagelliformis*, whose backbone is built up of (1→3)-linked units of α -L-fucopyranose, and branches included residues of α -D-glucuronic acid and α -L-fucofuranose. This compound at a concentration of 0.05 mg/ml potentiated phagocytosis of *S. cerevisiae* and *L. acidophilus* by neutrophils increasing relative quantity of phagocytes, as well as their effectiveness. Along with this, 14% increase of the concentration of membrane-bound integrin CD11c molecules was observed. The systemic effect of CF at a dose of 0.01 mg/mouse *i.p.* led to potentiation of cytotoxic activity of spleen mononuclear leucocytes towards melanoma cells of line B16 by 1.9-fold and towards chronic myelogenous leukemia cells of line K-562 by 1.7-fold. These results indicate that fucoidan CF can stimulate anti-infective and anti-tumor activity of effectors of the innate immune system via integrins CD11c.

Key words: fucoidans, leucocytes, natural killers, phagocytosis, cytotoxicity