

УДК [615.98:579.84]-06:612.017\ -085.322:582.272.46

Т.А. Кузнецова<sup>1</sup>, Л.М. Сомова<sup>1</sup>, Н.Г. Плехова<sup>1</sup>, Т.Н. Звягинцева<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)

## ПРИМЕНЕНИЕ ФУКОИДАНА ИЗ БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ *FUCUS EVANESCENS* ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

**Ключевые слова:** фукоидан, эндотоксинемия, липополисахарид, иммунитет.

Изучена возможность применения фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* для коррекции нарушений гуморального и клеточного иммунитета при экспериментальной эндотоксинемии, индуцированной введением липополисахарида. Выявлено ингибирование повышенного уровня провоспалительных цитокинов, частичное восстановление показателей адгезивной и бактерицидной активности нейтрофильных лейкоцитов на фоне индуцированной липополисахаридом иммунодепрессии, а также снижение степени микроциркуляторных нарушений в паренхиматозных органах, что способствует повышению резистентности животных к эндотоксину.

Актуальной проблемой лечения больных с эндотоксинемией является поиск препаратов для снижения негативного влияния эндотоксина и повышения резистентности организма к токсическому воздействию. Проникая в системный кровоток, липополисахарид (ЛПС), ответственный за все биологические эффекты эндотоксина, взаимодействует с гуморальными и клеточными факторами иммунитета и инициирует комплекс патологических процессов, включающих нарушения со стороны различных органов и систем макроорганизма. Развиваются кардиопульмональная и сосудистая дисфункции, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания, острая почечная и печеночная недостаточность и другие нарушения. Эти процессы являются результатом как прямого, так и опосредованного действия эндотоксина [2, 3, 9, 11].

Сульфатированный полисахарид из бурой водоросли *Fucus evanescens* — фукоидан, обладающий иммуномодулирующей, антикоагулянтной, противоопухолевой, антивирусной и другими видами активности [1, 4, 5], является одним из перспективных препаратов для коррекции иммунных нарушений при эндотоксинемии. Изучение данного вопроса поставлено целью настоящей работы.

**Материал и методы.** Фукоидан (сульфатированный полисахарид) выделяли методом горячей экстракции из бурой водоросли *F. evanescens* [7]. Эндотоксинемии индуцировали введением мышам ЛПС из *Yersinia pseudotuberculosis* в дозе  $6,25 \pm 0,5$  мг/кг, составляющей  $LD_{100}$ .

В экспериментах использовали неинбредных мышей и мышей линии BALB/c весом 20–22 г, которых распределили на следующие группы (по 10–15 особей): 1-я группа — животные, получившие ЛПС;

2-я группа — животные, получившие фукоидан однократно внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг и через сутки — ЛПС;

3-я группа — животные, получившие фукоидан по профилактической схеме десятикратно, а затем — ЛПС;

4-я группа — животные, получившие фукоидан однократно внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг (положительный контроль);

5-я группа — животные, получившие однократно внутрибрюшинно 0,5 мл 0,85% раствора NaCl (интактный контроль).

Мыши поступали из питомника «Столбовая» и содержались с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Экспериментальные исследования проведены с разрешения Комитета по биомедицинской этике НИИЭМ СО РАМН.

Защитный эффект фукоидана при разных схемах введения оценивали по проценту выживаемости и средней продолжительности жизни неинбредных мышей, получивших ЛПС. Функциональную активность нейтрофильных лейкоцитов перитонеальной полости оценивали по показателям адгезивности и теста с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) [10]. Уровень фактора некроза опухоли-α (TNFα) и интерлейкинов (IL) 1α и 6 в сыворотке крови мышей BALB/c определяли с помощью иммуноферментного анализа с использованием наборов BD Biosciences (BD OptEIA Set Mouse TNF(mono), США).

Животных выводили из опыта с использованием эфирного наркоза через 4, 7, 17 и 24 часа после введения ЛПС. Фрагменты миокарда, печени, почек и легких фиксировали в 10% нейтральном растворе забуференного формалина. Проводку материала и заливку в парафин осуществляли по стандартной методике. Из каждого образца готовили 3–5 срезов, которые окрашивали гематоксилином и эозином, для выявления отложений фибрина производили окраску по Шуенинову.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ «Биостат» и Excel, достоверность различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Средние величины и их ошибки вычисляли на основе 5–6 тестов, в каждом из которых кровь или экссудат перитонеальной полости собирали от пула из 10–15 животных.

**Результаты исследования.** Все животные 1-й группы, которым вводили ЛПС, погибали в течение суток (средняя продолжительность жизни –  $27,1 \pm 2,2$  часа). Однократное парентеральное введение фукоидана (2-я группа) не отражалось на показателях выживаемости (все мыши также погибали). При десятикратном введении фукоидана (3-я группа) выживаемость составила  $18,9 \pm 1,2\%$ , средняя продолжительность жизни –  $52,8 \pm 4,3$  часа.

Исследование функциональной активности нейтрофилов у мышей 1-й группы через 3 часа после введения летальной дозы ЛПС свидетельствовало о значительном (3–4-кратном) угнетении показателей адгезии и НСТ-теста по сравнению с таковыми в группе интактного контроля. Под влиянием однократного введения фукоидана у животных 2-й группы показатели адгезивной активности и бактерицидности нейтрофилов на фоне депрессии, вызванной введением ЛПС, статистически значимо возрастали, но оставались ниже таковых в группе интактного контроля. При десятикратном введении фукоидана (3-я группа) эти показатели восстанавливались в большей степени. У животных 4-й группы (положительный контроль), под влиянием фукоидана наблюдалось увеличение показателей адгезивной (в 1,8 раза) и бактерицидной (в 1,6 раза) активности нейтрофилов по сравнению с интактным контролем (табл.).

Влияние фукоидана на уровень цитокинов оценивали в динамике в течение 24 часов после введения ЛПС. Через 2 часа в 1-й группе выявлено значительное повышение концентрации TNF $\alpha$  и IL-1 $\alpha$  в сыворотке крови. По истечении 4 часов концентрация этих цитокинов снижалась и к 24 часам приближалась к показателям контрольной группы. При введении фукоидана (3-я группа) концентрация TNF $\alpha$  и IL-1 $\alpha$  на протяжении всего периода исследования была ниже, чем в 1-й группе (рис. 1, а). Динамика IL-6 имела иную закономерность, принимая максимальные значения через 8 часов с последующим снижением. Его концентрация также значительно превышала показатели интактных животных. Под действием фукоидана выявлены более низкие значения IL-6 по сравнению с таковыми в 1-й группе (рис. 1, б).

Патоморфологическое исследование выявило отсутствие патологических изменений в органах мышей 4-й группы (рис. 2, а). Их легкие, почки, сердце имели нормальное строение, как и у животных контрольной (5-й) группы.

Данные патоморфологического исследования органов-мишеней мышей, которым вводили ЛПС (1-я группа), свидетельствовали о гемоциркуляторных расстройствах с наличием сладжа эритроцитов и тромбов в сосудах микроциркуляторного русла, повышенной проницаемости сосудов и деструкции эндотелия, а также дистрофически-некробиотических изменений клеток паренхиматозных органов (рис. 2, б). Через 7 часов в печени обнаружено выраженное повреждение стенок сосудов с их плазматическим пропитыванием, фибриноидным набуханием и некрозом. В прилежащей паренхиме формировались очажки дегенеративно-воспалительных изменений. По истечении 17 часов после введения ЛПС в печени отмечено мозаичное поражение паренхимы с наличием больших полей дистрофически измененных и некротизированных гепатоцитов. Размеры гепатоцитов в этих участках варьировали. Встречались единичные двуядерные клетки. К концу срока наблюдения (24 часа) на фоне сосудистых изменений регистрировались типичные для псевдотуберкулеза некротические очажки с мелкозернистым детритом, многочисленные мелкие гранулемы без кариорексиса центральной зоны (рис. 2, в).

Таблица

Влияние фукоидана на функциональную активность нейтрофилов перитонеальной полости мышей при экспериментальной эндотоксинеми

| Группа | Адгезивная активность    |                 | Показатели НСТ-теста |                 |
|--------|--------------------------|-----------------|----------------------|-----------------|
|        | кол-во клеток            | ИС <sup>1</sup> | OD $\times 10^{-3}$  | ИС <sup>1</sup> |
| 1-я    | $365100 \pm 29200^2$     | 0,40            | $23,5 \pm 4,2^2$     | 0,30            |
| 2-я    | $596700 \pm 53200^{2,3}$ | 0,65            | $43,5 \pm 5,1^{2,3}$ | 0,56            |
| 3-я    | $704300 \pm 44500^{2,3}$ | 0,77            | $47,8 \pm 4,2^{2,3}$ | 0,61            |
| 4-я    | $1678000 \pm 126800^2$   | 1,83            | $123,4 \pm 15,4^2$   | 1,58            |
| 5-я    | $914600 \pm 75600$       |                 | $78,3 \pm 6,7$       |                 |

<sup>1</sup> Индекс стимуляции, рассчитанный как отношение показателей в опытной группе к таковым в контрольной (5-й группе).

<sup>2</sup> Разница с контролем (5-я группа) статистически значима.

<sup>3</sup> Разница с 1-й группой статистически значима.

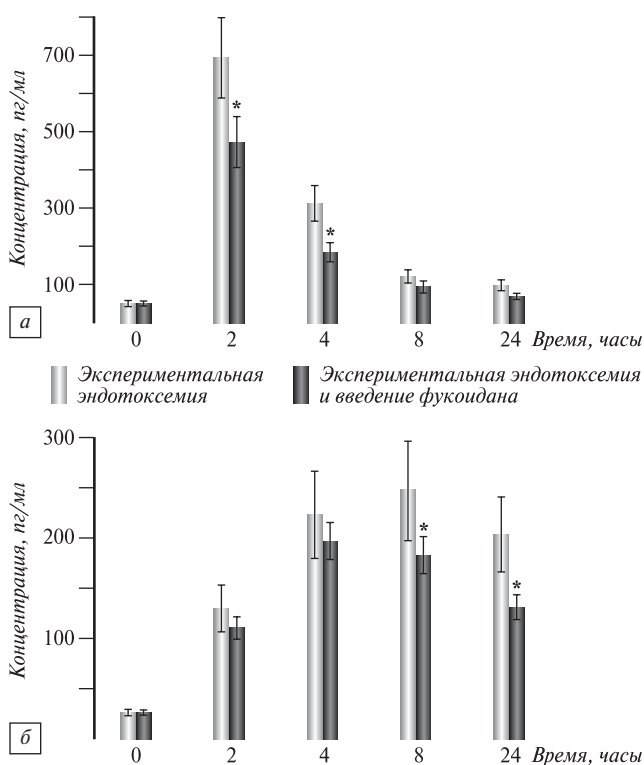


Рис. 1. Динамика уровней TNF $\alpha$  (а) и IL-6 (б) в сыворотке крови мышей BALB/c («звездочкой» обозначена статистическая достоверность различий между группами).



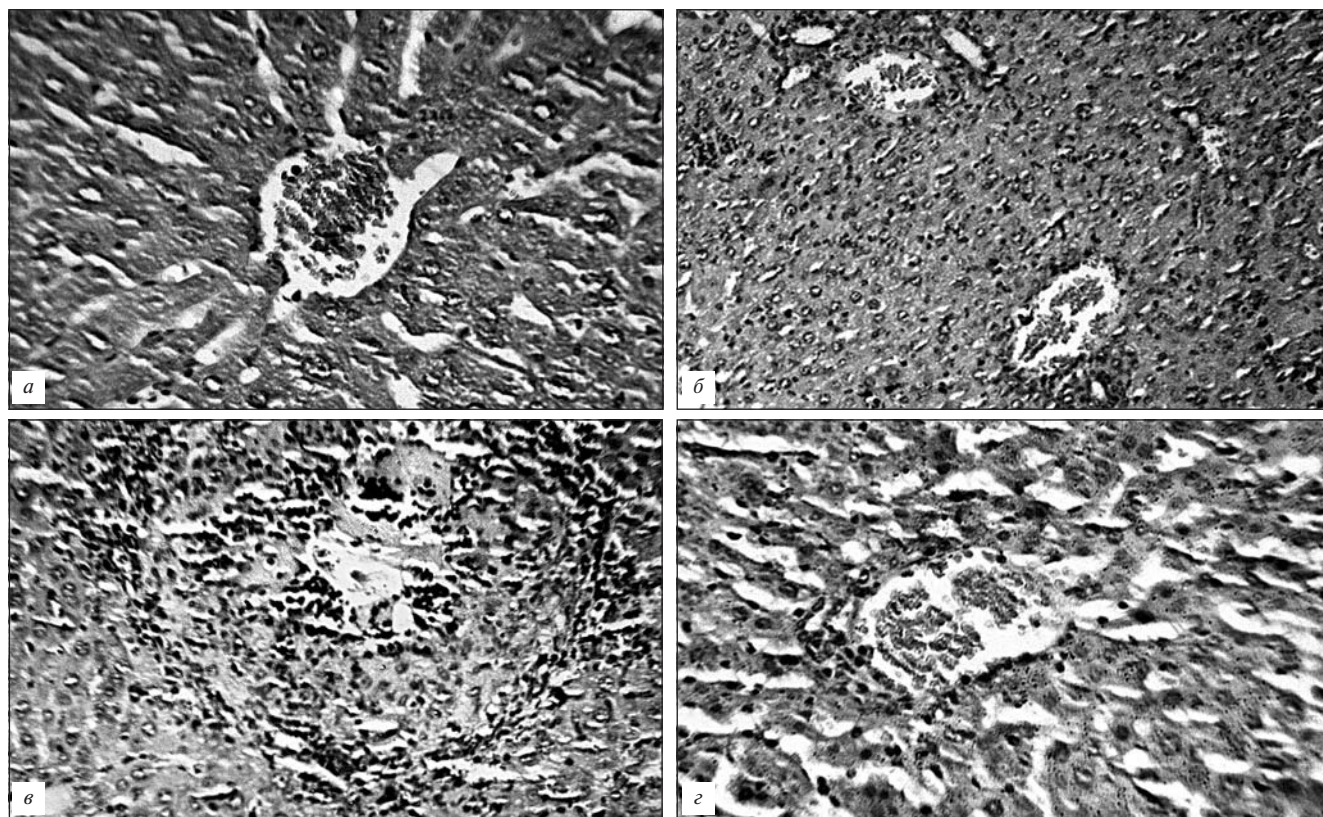


Рис. 2. Патогистология печени экспериментальных животных.

*а* — получавших только фукоидан; *б, в* — через 4 часа после введения ЛПС; *г* — получавших фукоидан в течение 2 недель до введения ЛПС. Окраска гематоксилином и эозином; *а, в, г* —  $\times 200$ , *б* —  $\times 100$ .

Исследование в динамике органов животных, которые получали профилактический курс инъекций фукоидана (3-я группа), показало, что в печени, почках и легких в основном сохранилась целостность эндотелиальной выстилки сосудов, в их просвете не обнаруживалось значительных отложений фибрина. В печени через 4 часа наблюдалось умеренное полнокровие внутридольковых и междольковых сосудов без деструктивных изменений эндотелия и гепатоцитов. Вместе с тем имелись очаговые изменения паренхимы в виде зернистой дистрофии и вариабельности размеров печеночных клеток, связанной, скорее всего, с их пикнозом (рис. 2, г). Через 24 часа обнаружена мозаичность рисунка печени за счет дистрофических и некробиотических изменений больших участков паренхимы. Здесь регистрировались зернистая дистрофия и некроз гепатоцитов, было нарушено строение печеночных балок. Изредка выявлялись двуядерные клетки (1–2 в поле зрения). О замедлении регенераторно-репаративных процессов свидетельствовало отсутствие реакции со стороны клеток Купфера. Встречались сосуды с фибриноидным набуханием стенок и повреждением эндотелия, но реже, чем у животных 1-й группы.

В целом степень нарушений микроциркуляции и дистрофически-некротических изменений органов животных, получивших фукоидан, по сравнению с 1-й группой была менее выражена.

**Обсуждение полученных данных.** Иницирующим звеном патогенеза сепсиса и эндотоксического шока является поступление в системный кровоток эндотоксина. Это дает начало сложному каскаду патологических процессов: развитию системной воспалительной реакции, полиорганной недостаточности, диссеминированному внутрисосудистому свертыванию крови, формированию вторичного иммунодефицита и другим осложнениям [2, 3, 8, 11, 13].

Наибольший клинический интерес вызывает влияние эндотоксина на основные защитные системы организма, в том числе на факторы врожденного и приобретенного иммунитета. В числе основных задач иммунокорригирующей терапии сепсиса стоит модуляция активности иммунокомпетентных клеток, продукции про- и противовоспалительных цитокинов, коррекция системной воспалительной реакции для предотвращения полиорганной недостаточности [6].

Нейтрофилы, являясь основной эндотоксинсвязывающей популяцией клеток крови, участвуют в процессах иммобилизации, транспорта и выведения ЛПС из организма [12, 14]. ЛПС, взаимодействуя с макрофагами, нейтрофилами и клетками эндотелия, стимулирует избыточную продукцию провоспалительных цитокинов, оказывающих повреждающее действие на ткани и органы, индуцируя эндотоксический шок [2, 8, 9, 12, 15].

В условиях нашего эксперимента под влиянием ЛПС установлено угнетение функциональной

активности нейтрофилов, гиперпродукция провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6), патологические изменения паренхиматозных органов-мишеней. При введении животным фукоидана из *F. evanescens* выявлена стимуляция функциональной активности нейтрофилов, в результате чего наблюдалось ослабление депрессивного влияния ЛПС на эти клетки. Под влиянием фукоидана также снижались повышенные уровни TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  и IL-6. Последнее особенно важно для понимания механизмов действия фукоидана, поскольку терапевтическая стратегия при лечении сепсиса и эндотоксического шока направлена против элементов гипервоспалительного каскада, в частности, против этих цитокинов.

Результаты исследований показали, что клинико-морфологические проявления бактериальной эндотоксинемии, вызванной ЛПС, менее выражены у животных, получивших фукоидан. Введение этого полисахарида способствует снижению степени микроциркуляторных нарушений и вторичных дистрофически-деструктивных изменений в печени, почках, легких. По-видимому, основное патогенетическое значение фукоидана связано с ослаблением повреждающего действия токсина на эндотелий кровеносных сосудов. Это препятствует развитию выраженных системных нарушений микроциркуляции и связанных с ними дистрофических и некротических изменений клеток паренхиматозных органов, приводящих к развитию полиорганной недостаточности.

Реализуя отмеченные выше механизмы, фукоидан способствует сглаживанию клинических проявлений эндотоксикоза, а в итоге повышает резистентность мышей к токсическому действию ЛПС: мы наблюдали повышение процента выживаемости (до 19%) и средней продолжительности жизни (в 2 раза) при 100% смертности животных, получивших летальную дозу эндотоксина.

Таким образом, фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* можно отнести к числу перспективных полисахаридов природного происхождения, повышающих резистентность организма к эндотоксинам. Применение фукоидана в комплексе лечения эндотоксинемии патогенетически обосновано и позволяет реализовать основные принципы коррекции нарушений гуморального и клеточного иммунитета.

#### Литература

1. Алексеев Т.В., Жанаева С.Я., Венедиктова А.А. и др. Противоопухолевая и антиметастатическая активность сульфатированного полисахарида фукоидана, выделенного из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2007. Т. 143, № 6. С. 675–677.
2. Еськов А.П., Каюмов Р.И., Соколов А.Е. Механизм повреждающего действия бактериального эндотоксина // Энтеросорбция как метод предотвращения эндотоксической агрессии: сб. статей. М., 2004. С. 19–23.
3. Игонин А.А., Кукес В.Г., Пальцев М.А. Сепсис: молекулярные механизмы системного воспаления в качестве модели для изучения перспективных терапевтических мишеней // Молекулярная медицина. 2004. № 2. С. 3–12.

4. Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. и др. Иммуностимулирующая и антикоагулянтная активность фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* // Антибиотики и химиотерапия. 2003. Т. 48, № 4. С. 11–13.
5. Макаренко И.Д., Компанец Г.Г., Беседнова Н.Н. и др. Скрининг биополимеров из морских гидробионтов, влияющих на адсорбцию вируса Хантаан // Вopr. вирусол. 2007. № 2. С. 29–32.
6. Нехаев И.В., Свиридова С.П., Мазурина О.Г. и др. Иммунокорректирующая терапия сепсиса // Сепсис в начале XXI века: практическое руководство / под ред. В.С. Савельева, Б.Р. Тельфанда. М.: Литтерра, 2006. С. 113–123.
7. Патент № 2135518 (РФ). Способ получения водорастворимых полисахаридов бурых водорослей / Т.Н. Звягинцева, Н.М. Шевченко, И.Б. Попивич и др. // Бюл. 1999. № 24. 3 с.
8. Рябиченко Е.В., Бондаренко В.М., Веткова Л.Г. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов // Журн. микробиол., эпидемиол и иммунобиол. 2004. № 3. С. 98–105.
9. Таболин В.А., Яковлев М.Ю., Ильина А.Я. и др. Патогенетические механизмы и клинические аспекты действия термостабильного эндотоксина кишечной микрофлоры // Русский мед. журн. 2003. Т. 11, № 3. С. 55–60.
10. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО, 1995. 220 с.
11. Яковлев М.Ю. «Эндотоксиновая агрессия» как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных // Успехи совр. биол. 2003. Т. 123, № 1. С. 31–40.
12. Abraham E., Carmody A., Shenkar R., Arcaroli J. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury // Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol. 2000. Vol. 279. P. 1137–1145.
13. Ayala A., Song G.Y., Chung C.S. et al. Immune depression in polymicrobial sepsis: the role of necrotic (injured) tissue and endotoxin // Crit. Care Med. 2000. Vol. 28, No. 8. P. 2949–2955.
14. Bouchon A., Dietrich J., Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes // J. Immunol. 2000. Vol. 164, No. 10. P. 4991–4995.
15. Edwin S., Theo J. C., Johan K. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock // Clin. Microbiology Reviews. 2003. Vol. 16, No. 3. P. 379–414.

Поступила в редакцию 07.04.2009.

#### APPLICATION OF BROWN ALGAE *FUCUS EVANESCENS*-DERIVED FUCOIDAN TO CORRECT IMMUNE DYSFUNCTIONS UNDER ENDOTOXINEMIA

T.A. Kuznetsova<sup>1</sup>, L.M. Somova<sup>1</sup>, N.G. Plekhova<sup>1</sup>, T.N. Zvyagintseva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the RAMS, Siberian Branch (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), <sup>2</sup> Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100-Anniversary Av. Vladivostok 690022 Russia)

**Summary** – The paper discusses possibility of applying fucoidan derived from the brown algae *Fucus evanescens* to correct humoral and cell-mediated immunity in cases of experimental endotoxemia caused by lipopolysaccharide. The authors revealed inhibition of higher level of proinflammatory cytokines, partial restoration of adhesive and bactericidal activities of neutrophilic leukocytes with parallel lipopolysaccharide-induced immunosuppression and reducing level of microcirculation disorders found in parenchymal organs very likely to increase animal's resistance to endotoxin.

**Key words:** fucoidan, endotoxemia, lipopolysaccharide, immunity.