

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

И.Д. Макаренко¹, Н.В. Крылова¹, Г.Н. Леонова¹, Н.Н. Беседнова¹, Т.Н. Звягинцева², Н.М. Шевченко²

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ²Тихоокеанский 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 α-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 LD₅₀/0,2 мл (инфекционный титр вируса 7,5 lg LD₅₀/0,2 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.

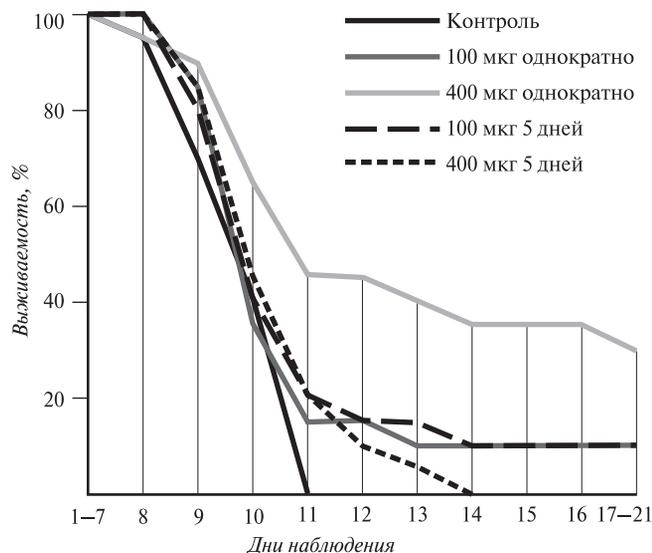


Рис. 1. Эффективность действия фукоидана из *L. japonica* на выживаемость мышей, инфицированных вирусом КЭ при внутрибрюшинном введении (профилактическая схема).

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

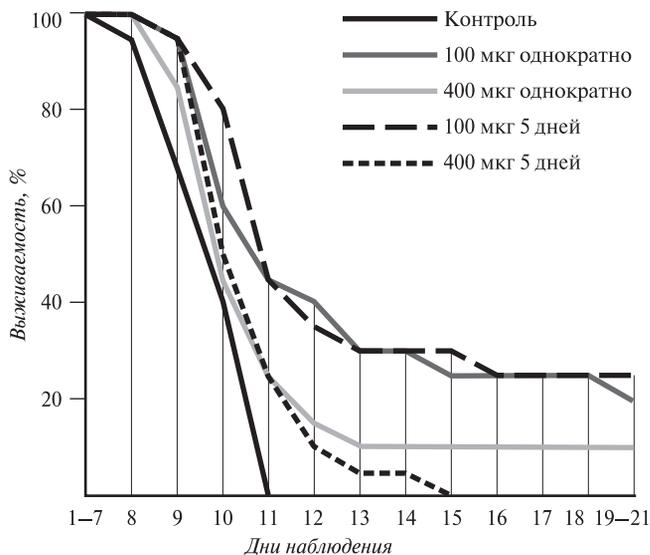


Рис. 2. Эффективность действия фукоидана из *L. japonica* на выживаемость мышей, инфицированных вирусом КЭ при внутримышечном введении (профилактическая схема).

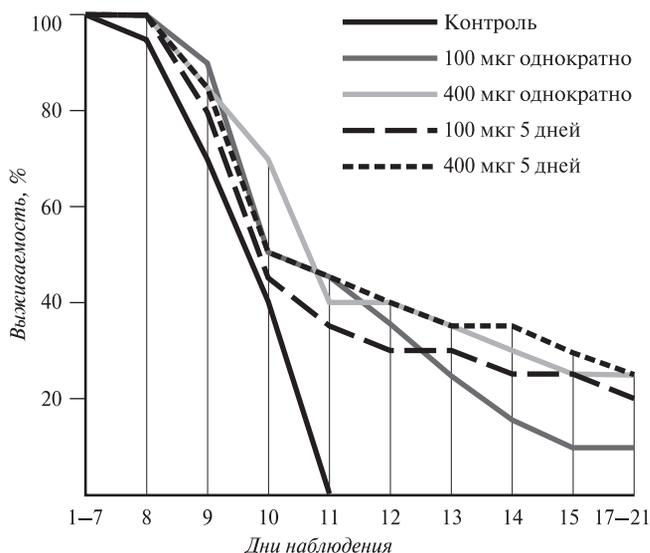


Рис. 3. Выживаемость мышей, инфицированных вирусом КЭ при внутримышечном введении фукоидана из *L. japonica* (лечебная схема).

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 γ -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.

10. Mytar B., Gawliska M., Szatanek R. et al. Induction of intracellular cytokine production in human monocytes/macrophages with ligands of pattern recognition receptors // *Inflamm. Res.* 2004. Vol. 101, No. 3. P. 100–106.
11. Ponce N.M., Pujol C.A., Damonte E.B. et al. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies // *Carbohydr. Res.* 2003. Vol. 338, No. 2. P. 153–165.
12. Preeprame S., Hayashi K., Lee J.B. et al. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri* // *Chem. Pharm. Bull.* 2001. Vol. 49, No. 4. P. 484–485.
13. Zhu W., Chiu L.C., Ooi V.E. et al. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2 // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2004. Vol. 24, No. 3. P. 279–283.
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, Is. 1. P. 1–13.

Поступила в редакцию 07.04.2009.

PROTECTIVE EFFECTS OF FUCOIDAN DERIVED FROM BROWN ALGAE *LAMINARIA JAPONICA* UNDER EXPERIMENTAL TICK-BORNE ENCEPHALITIS
I.D. Makarenkova¹, N.V. Kryilova¹, G.N. Leonova¹, N.N. Besednova¹, T.N. Zvyagintseva², N.M. Shevchenko²
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 – The paper provides experimental study into the protective effects of sulphated polysaccharide fucoidan derived from the sea brown algae *Laminaria japonica* after in vivo infecting mice with highly pathogenic strain of tick-borne encephalitis virus. As reported, the drug efficiency depends on dose and dosing regimen, and it allows obtaining adequate protection in infected animals. A wide range of biological effects produced by the sulphated polysaccharides extracted from the sea brown algae, low toxicity and environmentally friendly production technologies offer great opportunities of applying fucoidans in an effort to prevent and treat viral infections.
Key words: virus, tick-borne encephalitis, fucoidan, protective effects, survival rate.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 83–86.

УДК 616-006-085.322:582.272:577.14

О.С. Вишук¹, С.П. Ермакова², Фам Дюк Тин³, Н.М. Шевченко², Буи Минг Ли³, Т.Н. Звягинцева²

¹ Дальневосточный государственный университет (690950 г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27), ² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Россия (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159), ³ Нячангский институт технологических исследований и применений ВАНТ (Вьетнам г. Нячанг, ул. Хунгвонг, 02)

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФУКОИДАНОВ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

Ключевые слова: фукоиданы, бурые водоросли, противоопухолевая активность.

Противоопухолевое действие фукоиданов из 9 видов бурых водорослей исследовано на модели мягких агаров. Показано, что фукоиданы нетоксичны к клеткам DLD-1 и HT-29 в концентрациях до 200 мкг/мл. Установлено, что фукоидан из *Laminaria cichorioides*, состоящий из 1,3-связанных молекул α-L-фукозы, ингибирует рост колоний раковых клеток кишечника, а низкосульфатированные фукогалактаны из *Sargassum swartzii*, *S. mcClurei*, *S. denticarpum* практически не обладают противоопухолевой активностью. Полученные результаты демонстрируют, что использование фукоиданов бурых водорослей дальневосточных морей может оказаться перспективным для предотвращения и лечения онкологических заболеваний.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению полисахаридов, выделенных из таких природных источников, как бактерии, грибы, водоросли и растения. Полисахариды бурых водорослей представлены альгиновыми кислотами, ламинаранами и фукоиданами, проявляющими различную биологическую активность. Так, альгинат натрия является самым активным и безвредным природным сорбентом, а также повышает фагоцитарную активность клеток животных и человека [10]. Ламинараны (1,3- и 1,6-β-D-глюканы) известны как противораковые вещества, радио- и криопротекторы, активаторы иммунной системы [3, 15]. Фукоиданы

проявляют чрезвычайно широкий спектр биологической активности, что является причиной повышенного интереса к ним. Так, в литературе имеются сообщения о противоопухолевых и противовоспалительных свойствах фукоиданов [11, 12]. Особый интерес вызывает антикоагулянтное действие фукоиданов [2, 6]. Кроме того, эти соединения, как правило, являются иммуностимуляторами [13]. По этой причине их можно отнести к так называемым «поливалентным биомодуляторам». Однако интенсивность изучения биологической активности фукоиданов значительно опережает исследования их химической структуры.

Имеется небольшое количество данных о связи структуры и биологической активности этих полисахаридов. Считается, что биологическая активность фукоиданов обусловлена в первую очередь степенью сульфатирования, наличием фрагментов определенной структуры. Кроме того, она может быть связана с моносакхаридным составом, степенью разветвленности, типом связи, молекулярно-массовым распределением [1, 9, 14]. С определенной уверенностью установить структурный мотив, который отвечает за проявление той или иной биологической активности фукоиданов, пока так и не удалось.

Целью настоящей работы явился анализ противоопухолевой и антимагистатической активности фукоиданов, выделенных из различных бурых

Ермакова Светлана Павловна – канд. хим. наук, старший научный сотрудник лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН, тел: 8 (4232) 31-07-05, добавочный.4; e-mail: swetlana_e@mail.ru.