

2. Галевская Л.В., Рюмина Е.В., Богомаз Т.А. и др. Механизмы воздействия фукоидана на компонент человека // Биомедицинская химия. 2001. Т. 49, № 6. С. 24–27.
3. Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Мамаев А.Н. и др. Антикоагулянтная активность фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* // Бюлл. экпер. биол. и мед. 2003. Т. 136, № 1. С. 532–534.
4. Куэрос К., Ассис К., Медейрос В. и др. Цитотоксический эффект полисахридов, выделенных из водорослей, на HL 60 клетки // Биохимия. 2006. Т. 71, № 12. С. 1613–1617.
5. Barrett A., Kirschke H. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L // *Methods Enzymol.* 1981. Vol. 80. P. 535–561.
6. Berteau O., Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide // *Glycobiol.* 2003. Vol. 13, No. 6. P. 29R–40R.
7. Fehrenbacher N., Jaattela M. Lysosomes as targets for cancer therapy // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65. P. 2993–2995.
8. Lah T.T., Calaf G., Kalman E. et al. Cathepsins D, B, and L in transformed human breast epithelial cell // *Breast Cancer Res. Treatment.* 1996. Vol. 39. P. 221–233.
9. Laurent-Matha V., Maruani-Herrmann S., Prebois C. et al. Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth // *J. Cell Biol.* 2005. Vol. 168, No. 3. P. 489–499.
10. Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T. et al. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities // *J. Boil. Chem.* 1993. Vol. 268, No. 29. P. 21771–21776.
11. Pereira M.S., Mulloy B., Mourao A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, No. 12. P. 7656–7667.
12. Philchenkov A., Zavelevich M., Imbs T. et al. Sensitization of human malignant lymphoid cells to etoposide by fucoidan, a brown seaweed polysaccharide // *Exp. Oncol.* 2007. Vol. 29, No. 3. P. 181–185.
13. Pomin V.H., Pereira M.S., Valente A-P. et al. Selective cleavage and anticoagulant activity of a sulfated fucans: stereospecific removal of a 2-sulfate ester from the polysaccharide by mild acid hydrolysis, preparation of oligosaccharides, and heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity // *Glycobiol.* 2005. Vol. 15, No. 4. P. 369–381.
14. Pomin V.H., Mourao P.A.S. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans // *Glycobiol.* 2008. Vol. 18, No. 12. P. 1016–1027.
15. Wiederanders B., Oelke B. Accumulation of inactive cathepsin D in old rats // *Mech. Ageing Dev.* 1984. Vol. 24, No. 3. P. 265–271.

Поступила в редакцию 10.04.2009.

ANTICANCER AND ANTIMETASTATIC ACTIVITY OF SULPHATED POLYSACCHARIDE FUCOIDAN DERIVED FROM THE OKHOTSK SEA BROWN ALGAE *FUCUS EVANESCENS*

S.Ya. Zhanaeva, T.V. Alekseenko, T.A. Korolenko, T.N. Zvyagintseva
 Research Institute of Physiology of the RAMS, Siberian Branch (4 Academian Timakov St. Novosibirsk 630117 Russia)
 Summary – In vitro model of transplantable Lewis's pulmonary adenocarcinoma in C57BL/6 mice allowed to study anticancer and antimetastatic effect of the sulphated polysaccharide fucoidan derived from the Okhotsk Sea brown algae *Fucus evanescens*. As shown, the intensity of antimetastatic effects depended on the dose of the drug. Single or repeated introduction of the drug in the dose of 10 mg/kg induced spontaneous moderate antimetastatic effect and potentiated antimetastatic but not anticancer activity of cyclophosphan. The smaller and larger doses (5 and 25 mg/kg) did not result in any noticeable effects on the growth and dissemination of adenocarcinoma. Combined with cyclophosphan, the fucoidan applied in the dose of 25 mg/kg intensified toxic action of the cytostatic drug.
Key words: experimental tumor, fucoidan, cyclophosphan, cathepsins.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 90–93.

УДК 616.24-001.18/19-085.23

А.Л. Шутикова¹, С.С. Целуйко², Т.С. Запорожец¹, Л.М. Эпштейн³, Н.Н. Беседнова¹

¹ НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ² Амурская государственная медицинская академия (675000 г. Благовещенск, ул. Горького, 95), ³ Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр (690950 г. Владивосток, пер. Шевченко, 4)

ВЛИЯНИЕ МОЛЛЮСКАМА НА МУКОЦИЛИАРНУЮ СИСТЕМУ ВОЗДУХОНОСНОГО ОТДЕЛА ЛЕГКИХ И СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ГИПОТЕРМИИ

Ключевые слова: слизистая оболочка трахеи, биологически активные вещества, моллюскам, гипотермия.

В эксперименте изучено влияние моллюскама – комплекса аминокислот и дипептидов – на мукоцилиарную систему воздухоносного отдела легких и свободнорадикальные процессы при гипотермии. Работа выполнена на 60 крысах-самцах, 40 из которых охлаждали в климатокамере (в т.ч. 20 животных, получавших моллюскам). Проведены электронно-микроскопическое и биохимическое исследования. Показано, что введение биологически активной добавки оказывало защитное действие, предупреждая как изменения слизистой оболочки трахеи, так и усиление процессов липопероксидации.

Проблема экологической детерминированности функционального состояния дыхательной системы и формирования патологии органов дыхания является осо-

бенно актуальной в условиях Дальнего Востока. В этом регионе в структуре заболеваемости населения ведущее место занимают неспецифические болезни легких. Показатель заболеваемости населения Дальнего Востока данной патологией превышает показатели по России на 40% [2]. Главными неблагоприятными климатическими факторами региона являются холод и влажность. Адаптация к холодному воздействию может продолжаться до 5–7 лет и сопровождается целым рядом функциональных нарушений и морфологических изменений, в большей степени затрагивающих органы дыхания и кожу [4]. Морфологические изменения при холодной адаптации обусловлены нарушением целостности клеточных мембран, активированием перекисного окисления липидов, нарушением антиоксидантной защиты, напряжением кислородного

Шутикова Анна Леонидовна – мл. науч. сотрудник лаборатории иммунологии НИИЭМ СО РАМН; тел.: 8 (4232) 44-24-46; e-mail: shutikova79@mail.ru.

режима, изменением реологических свойств крови, нарушением моторики ресничек мерцательного эпителия и ослаблением факторов местного иммунитета слизистой оболочки дыхательных путей [4].

В последнее время при поиске новых криопротекторов, используемых для профилактики заболеваний органов дыхания, особенно в холодное время года, исследователи все больше внимания уделяют биологически активным веществам и разработанным на их основе биологически активным добавкам к пище, облегчающим адаптацию к холоду и предназначенным для коррекции иммунных нарушений и свободнорадикальных процессов, инициированных влиянием низких температур. К числу таких препаратов относятся моллюскам – комплекс свободных аминокислот и гистидинсодержащих дипептидов, выделенный из двустворчатых и головоногих моллюсков. Ранее было показано, что моллюскам обладает иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами [8].

Целью настоящей работы явилось экспериментальное обоснование применения моллюскам для облегчения адаптации к холоду воздухоносного отдела легких.

Материал и методы. Работа выполнена на 60 неинбредных крысах-самцах массой 200 г, находившихся на стандартной диете в боксированных помещениях с соблюдением всех правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах [9]. Разброс по массе тела животных – не более 10%. Экспериментальные исследования проведены с разрешения Комитета по биомедицинской этике НИИЭМ СО РАМН (протокол № 3/2 от 14.07.2004 г.).

Для формирования холодового воспаления крыс помещали в климатоканеру Foentron (ГДР), создающую постоянный режим охлаждения при -15°C в условиях относительной влажности окружающего воздуха от 70 до 80%. В камере предусматривалась подача воздуха для предупреждения гипоксии, световой режим, нахождение животных в свободном состоянии.

В работе использовали биологически активное вещество – моллюскам [5]. Химический состав моллюскам: свободные аминокислоты (таурин, аспарагиновая кислота, треонин, глутаминовая кислота, пролин, глицин, аланин, цистеин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, β -аланин, орнитин, лизин, гистидин, аргинин) – 56–71%, липиды – менее 1%, белки – 19–25%, углеводы – менее 1%, минеральные вещества – 7,9–8,5%, гистидинсодержащие дипептиды – 2–14,3%. Все животные были разделены на 3 группы по 20 особей:

1. Контрольная группа – интактные животные, которых содержали в стандартных условиях вивария при температуре $+18$ – 20°C ;
2. Группа «холод» – животных охлаждали в течение 28 дней по 3 часа ежедневно при температуре -15°C .
3. Опытная группа – животные, которые ежедневно в течение 14 дней получали перорально моллюскам

в дозе 10 мг/кг, после чего их охлаждали в течение 28 дней по 3 часа ежедневно при температуре -15°C на фоне введения биологически активного вещества (за 30 мин до охлаждения).

По окончании эксперимента у крыс под эфирным наркозом извлекали трахею. Кусочки ее слизистой оболочки фиксировали в охлажденном 2,5% глютаральдегиде на какодилатном буфере, трижды отмывали фосфатным буфером (рН 7,3–7,4), дофиксировали 1% раствором OsO_4 , обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации (до 100%) и готовили для электронно-микроскопического исследования по Б. Уикли [7]. Полутонкие срезы окрашивали толуидиновым синим или тионином. Микроскопирование и фотографирование осуществляли на фотомикроскопе Microphot-FXA (Nikon, Япония). Для контрастирования ультратонких срезов использовали насыщенный раствор уранилацетата и цитрат свинца (Serva). Срезы просматривали в электронном микроскопе JEM-100CXII (Jeol, Япония). Для сканирующей электронной микроскопии материал готовили по соответствующей методике [6]. Обезвоживание осуществляли на аппарате НСР-2 (Япония). Вакуумное напыление проводили углеродом и золотом на установке УВ-3, НИЦ-5В (Япония). Микроскопирование выполняли на электронном растровом микроскопе Hitachi-520 (Япония) при ускоряющем напряжении 25 кВ. У всех экспериментальных животных исследовали также показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты. Содержание малонового диальдегида и витамина Е в периферической крови определяли согласно общепринятым методикам [1, 3].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Биостат» и Excel. Использовали следующие методы: проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений (W-критерий Шапиро–Уилка), t-критерий Стьюдента (для независимых выборок).

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. По данным трансмиссионной электронной микроскопии клеточный состав слизистой оболочки трахеи интактных крыс был представлен шестью видами клеток: реснитчатыми ($52,3 \pm 4,3\%$), бокаловидными ($11,53 \pm 1,1\%$), промежуточными ($10,57 \pm 0,9\%$), базальными ($21,3 \pm 1,8\%$), мигрирующими тучными ($2,3 \pm 0,8\%$) и щетинчатыми ($2,0 \pm 0,6\%$). Апикальная поверхность реснитчатой клетки покрыта регулярно расположенными ресничками (от 80 до 100). В промежутке между ними помещаются микроворсинки. Основное количество митохондрий располагается ближе к апикальному полюсу клетки. Митохондрии имеют плотный матрикс и большое количество крист, расположенных перпендикулярно их длиннику. Эндоплазматическая сеть представлена гранулярным ретикуломом. В надъядерной зоне часто встречается комплекс Гольджи и единичные лизосомы. Ядро клеток овальное, содержит одно ядрышко.

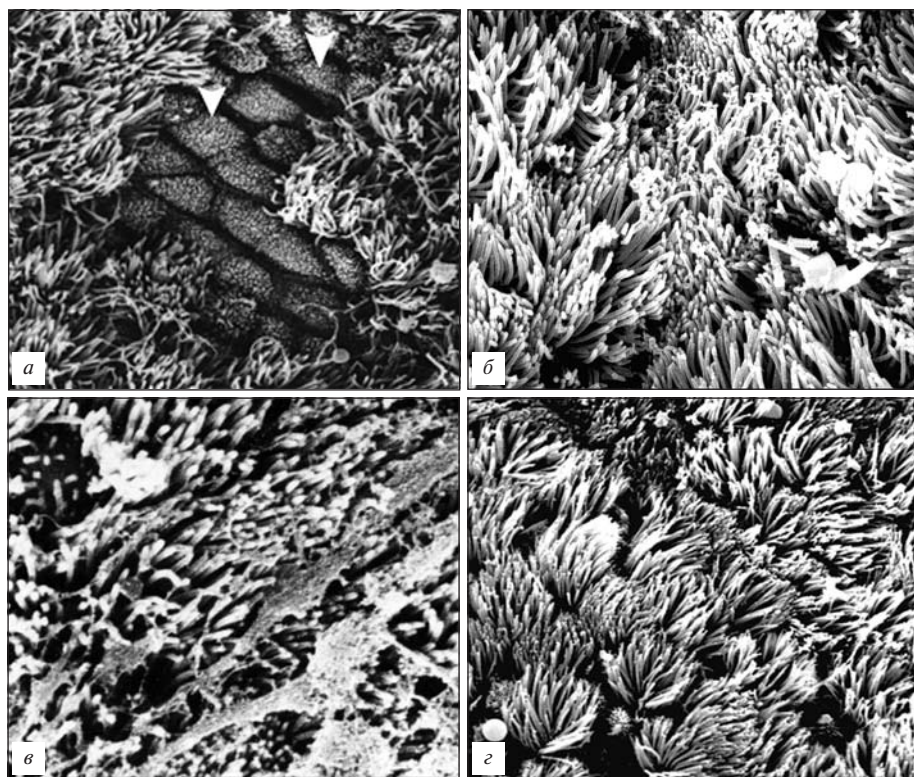


Рис. Поверхность слизистой оболочки трахеи крыс.

а – intactные крысы: островки, состоящие из бокаловидных клеток (стрелки); *б*, *в* – крысы, подвергнутые охлаждению: нарушение мукоцилиарного транспорта в результате «склеивания» ресничек (*б*) и скопления слизи на их поверхности (*в*); *г* – крысы, подвергнутые охлаждению на фоне введения моллюскама: нормальный рельеф: между ресничками выделяются апикальные полюса бокаловидных клеток с большим количеством микроворсинок. Сканирующая электронная микроскопия; *а* – $\times 2000$, *б* – $\times 1000$, *в* – $\times 5000$, *г* – $\times 5000$.

Бокаловидные клетки у intactных крыс сгруппированы по 5–20 штук, имеют развитый комплекс Гольджи, способный секретировать гранулы гликопротеидов (рис., *а*). У клеток, не имеющих секрета, микроворсинки мелкие, напоминающие шарики, прикрепленные к поверхности в большом количестве (более 200 штук). По мере созревания и скапливания секрета под апикальной мембраной наблюдается увеличение высоты микроворсинок с одновременным уменьшением апикальной поверхности клетки с последующим появлением на поверхности ресничек гранул диаметром 0,1–0,5 мкм. Соотношение бокаловидных клеток к реснитчатым составляет 1:4,54.

При длительном вдыхании охлажденного воздуха наблюдалась перестройка эпителия слизистой оболочки трахеи, сопровождающаяся нарушением регулярного расположения ресничек. В одних случаях они образовывали скопления по 20–60 штук, в других – направление ресничек в различные стороны приводило к исчезновению поперечных волн движения, хорошо различимых у intactных животных (рис., *б*). В реснитчатых клетках регистрировались дегенеративные изменения: на апикальном полюсе значительно увеличивалось количество разветвленных митохондрий и рибосом, отчетливо выявлялись тонофибриллы. Часть реснитчатых клеток имела в апикальном полюсе расширенные каналы эндоплазматического ретикулума. Образующиеся вакуоли сливались, формируя значительные скопления секрета. В этих клетках обнаруживались разбухшие митохондрии, расширенные цистерны эндоплазматического ретикулума. Матрикс митохондрий приобретал значительную плотность, нередко маскируя кристы.

В слизистой оболочке трахеи крыс, подвергнутых охлаждению, значительно увеличивалось содержание мигрирующих тучных клеток, отличаясь от такового у intactных животных. Содержание бокаловидных клеток также увеличивалось (табл. 1). Отдельные бокаловидные клетки содержали в апикальной части значительные скопления гликопротеидов. Апикальная поверхность клеток выступала над ресничками, образуя купола, лишённые микроворсинок. Увеличение содержания бокаловидных и мигрирующих тучных клеток приводило к гиперсекреции слизи, что подтверждалось как увеличением ее количества на поверхности слизистой оболочки, так и изменением соотношения реснитчатых и бокаловидных клеток (1:3,59). Характер слизи при этом был различным. В ряде случаев наблюдали слизистый мелкопористый материал, располагающийся на поверхности ресничек. Однако в ряде наблюдений объем этого секрета значительно увеличивался, формировались сложные полимеризованные структуры мукополисахаридов (рис. *в*). При холодовом воздействии снижался регенерационный потенциал эпителия слизистой оболочки трахеи за счет уменьшения количества промежуточных и базальных клеток (табл. 1).

Таким образом, при действии холода нарушается регулярное расположение ресничек, снижается регенерационный потенциал эпителия слизистой оболочки трахеи за счет уменьшения количества промежуточных и базальных клеток, содержание бокаловидных и мигрирующих тучных клеток увеличивается, что приводит к увеличению выработки слизи.

Пероральное введение моллюскама экспериментальным животным оказывало выраженное защитное

Таблица 1
Сравнительная характеристика морфометрических показателей слизистой оболочки трахеи экспериментальных животных

Показатель	Группа			
	1-я	2-я	3-я	
Клетки покровно-эпителиальные	реснитчатые, %	52,3±4,3	52,6±4,4	52,4±4,3
	бокаловидные, %	11,53±1,1	14,7±1,3	10,8±1,2
	промежуточные, %	10,57±0,9	4,4±0,4 ¹	11,1±0,92
	базальные, %	21,3±1,8	15,5±1,3 ¹	21,8±1,9
	щетинчатые, %	2,0±0,6	2,0±0,7	2,0±0,6
	мигрирующие тучные, %	2,3±0,8	10,3±0,9 ¹	2,6±0,7
Ширина базальной пластины, мкм	3,2±0,2	4,0±0,3 ¹	3,4±0,2	
Высота эпителиального пласта, мкм	18,3±1,0	20,1±1,6	18,7±1,1	

¹ Различия статистически значимы по сравнению с контролем.

действие на эпителий слизистой оболочки, предупреждая изменения, характерные для холодового воздействия. Реснитчатый покров у крыс, получавших моллюскам, сохранял характерный волнообразный рельеф, хотя на поверхности ресничек в небольшом количестве выявлялись клеточные элементы и слизь. При сканирующей электронной микроскопии поверхность бокаловидных клеток не отличалась от таковой интактных крыс. Бокаловидные клетки встречались чаще группами (по 5–10), на поверхности выявлялось большое количество мелких микроворсинок (рис., г). По данным трансмиссионной электронной микроскопии, бокаловидные клетки имели обычные размеры. Секреторная активность этих клеток характеризовалась обилием гранул секрета у апикального полюса и отсутствием его на поверхности. При ультраструктурном анализе органоидов реснитчатых клеток отмечено их нормальное строение. Клеточный состав и морфометрические показатели слизистой оболочки при сочетанном действии моллюска и холода значимых отличий от интактных животных не имели (табл. 1).

У этих же животных были исследованы показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в плазме крови при действии холода. Было установлено, что общее охлаждение крыс в течение 28 дней вызывает значимое повышение содержания вторичного продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида и снижение уровня витамина Е. Введение крысам моллюска предупреждало усиление процессов перекисного окисления липидов и перерасход витамина Е при холодовом стрессе: концентрация этих соединений оставались на уровне показателей контрольной группы (табл. 2).

Таким образом, предварительное (перед холодовым воздействием) и последующее введение крысам моллюска предупреждало как изменения слизистой оболочки трахеи, характерные для холодового воздействия, так и усиление процесса липопероксидации, снижая расход природных антиоксидантов, в частности, витамина Е. На основании полученных экспериментальных

Таблица 2
Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы в плазме крови крыс

Группа	Малоновый диальдегид, нмоль/л	Витамин Е, мкг/мл
1-я	4,90±0,37	43,38±4,30
2-я	6,06±0,34 ¹	32,48±2,29 ¹
3-я	4,97±0,24	39,77±2,15

¹ Различия статистически значимы по сравнению с контролем.

данных можно рекомендовать моллюскам для профилактики заболеваний органов дыхания, особенно в холодное время года.

Литература

1. Бородин Е.А., Арчаков А.И. Стабилизация и реактивация цитохрома Р-450 фосфатидилхолином при перекисном окислении липидов // Биол. мембраны. 1987. № 7. С. 719–728.
2. Иванов Е.М. Здоровье населения Приморья, состояние и прогноз // Мед.-фарм. вести Приморья. 1998. № 5. С. 7–9.
3. Кисилевич Р.Ш., Скварко С.И. Об определении витамина Е в крови // Лаб. дело. 1972. № 8. С. 473–475.
4. Пастухов Ю.Ф., Максимов В.В., Хаскин А.Л. Адаптация к холоду и условиям Субарктики: проблемы термифизиологии. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2003. Т. 1. 373 с
5. Пивненко Т.Н., Давидович В.В., Позднякова Ю.М. и др. Продукт, обогащенный свободными аминокислотами, и способ его получения: патент РФ № 2171066 от 22.03.2000. Владивосток, 2000.
6. Ровенский Ю.А. Растровая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток. М.: Медицина, 1979. 150 с.
7. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих / пер. с англ. М.: Мир, 1975. 310 с.
8. Шутикова А.Л. Иммуномодулирующие и антиоксидантные свойства биологически активных веществ из морских гидробионтов и их использование в гериатрической практике: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 2009. 25 с.
9. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes Strasbourg, 18. III. 1986 - URL: <http://convention.coe.int/Treaty/rus/Treaties/Html/123.htm> (последнее обращение 2.03.2009).

Поступила в редакцию 02.04.2009.

MOLLUSKAM'S EFFECT ON MUCOCILIARY SYSTEM OF AIR-BEARING PART OF LUNGS AND FREE RADICAL PROCESSES UNDER HYPOTHERMIA
A.L. Shutikova¹, S.S. Tseluyiko², T.S. Zaporozhets¹, L.M. Epstein³, N.N. Besednova¹

¹ Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the RAMS, Siberian Branch (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia),
² Amursky State Medical Academy (95 Gorkiy St. Blagoveshchensk 675000 Russia),
³ Pacific Research Fishery Centre (4 Shevchenko Lane, Vladivostok 690950 Russia)

Summary – The paper provides detailed information about in vitro researching into the effects of molluskam being a complex of amino acids and dipeptides on the mucociliary system of air-bearing part of lungs, and free radical processes under hypothermia. All the researches were performed on sixty male-rates, the forty ones being cooled in the climatic chamber (including those twenty animals that had been receiving molluskam). Electron microscopic and biochemical studies allowed to see this dietary supplement having protective effect, preventing any changes in the mucous tunic of trachea and intensifying lipoperoxidation.

Key words: mucous tunic of trachea, biologically active substances, molluskam, hypothermia.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 93–96.