

УДК615.36:577.11/.12]:574.52

Н.Н. Беседнова, Т.С. Запорожец

МОДИФИКАТОРЫ БИОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМА ИЗ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН
(г. Владивосток)

Ключевые слова: иммуномодуляторы, морские биополимеры, фукоиданы, антикоагулянты.

В последние десятилетия происходит активное освоение морских ресурсов в качестве источников новых биологически активных веществ (БАВ). В настоящем обзоре представлены результаты многолетних исследований, проведенных совместно с учеными Тихоокеанского института биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН и Тихоокеанским научно-исследовательским рыбохозяйственным центром (ТИНРО-центром), биологически активных веществ из гидробионтов Тихого океана. В процессе работы были изучены биологические свойства свыше 500 веществ из различных гидробионтов — беспозвоночных, рыб, водорослей, морских бактерий и пр. Более глубоко были исследованы — тинростим, зостерин, транслам, митилан, фукоидан и ДНК из молок лососевых рыб.

Тинростим — комплекс пептидов, выделенный из нервной ткани дальневосточного кальмара *Berriuthis magister*. Молекулярная масса пептидов составляет от 1 до 12 кДа. Способ получения тинростима защищен патентом РФ. Комплекс разрешен к применению в виде биологически активной добавки (БАД) к пище.

Зостерин — низкометаксилированный пектин, выделенный из морских трав семейства *Zosteraceae*. Основная углеводная цепь состоит из блоков а (1>4) полигалактуроновой кислоты. Способ получения зостерина защищен патентом РФ. Разрешен к применению в виде БАД.

Транслам — разветвленный Р-1,3:1,6-О-глюкан, полученный путем ферментативного синтеза из ламинарана бурой водоросли *Laminaria cichorioides*. Молекулярная масса транслама — 8–10 кДа. Способ получения транслама защищен авторским свидетельством РФ.

Митилан — углеводно-белковый комплекс, выделенный из мантии мидии *Crenomytilus grajanus*. Молекулярная масса — 3000 кДа. Углеводный компонент митилана (90–95%) — высокоразветвленный гликогенподобный α-1,4:1,6-О-глюкан. Белковая часть составляет 5–10% и является галактозоспецифическим лектином [7]. Способ получения митилана защищен авторским свидетельством.

Фукоидан — сульфатированный гетерополисахарид, выделенный из бурой водоросли *Fucus evanescens*. Молекулярная масса фукоидана составляет 30 кДа. Способ получения защищен патентом РФ.

ДНК получали из молок лососевых рыб методом солевой экстракции. В состав БАВ ДНК входит 79,0% ДНК, 7,8% белка, 2,1% липидов и 10,7% воды. Молекулярная масса ДНК составляет 270–500 кДа. Способ получения ДНК защищен патентом РФ.

Эксперименты, проведенные на различных лабораторных животных (инбредные и неинбредные мыши, морские свинки, кролики, цыплята), а также клеточных культурах, показали, что иммуномодулирующие свойства присущи в той или иной степени всем вышеперечисленным биополимерам, а различия носят количественный характер.

Главной мишенью изученных биологически активных веществ (БАВ) в организме являются фагоцитирующие клетки, в большей степени — клетки моноцитарно-макрофагального ряда [3, 5, 6, 8, 16, 22]. Сотрудниками НИИ ЭМ СО РАМН детально исследовано влияние БАВ на функциональную активность макрофагов. В сравнительных экспериментах показано, что воздействие всех исследованных биополимеров на макрофаги влечет за собой появление стереотипных признаков активации: изменение активности лизосомальных и мембранных ферментов, усиление энергетического и окислительного метаболизма, синтетических и секреторных процессов, способности к хемотаксису, поглощению и цитотоксичности, изменение адгезивных свойств и рецепторной функции плазматической мембраны.

О стимуляции функциональной активности макрофагов свидетельствуют ультраструктурные особенности этих клеток, инкубированных с БАВ, что проявляется при исследовании в электронном микроскопе отчетливыми изменениями поверхностной мембраны клеток с образованием многочисленных псевдоподий, дисперсией хроматина и расширением ядерных пор, появлением признаков усиления белоксинтетических и биоэнергетических процессов [18, 26].

В работах Н.Н. Беседновой и Т.С. Запорожец [1], Н.Н. Беседновой и Л.М. Эпштейна [3, 4], Т.В. Пушкаревой [26] представлены материалы, характеризующие усиление поглотительной и переваривающей активности макрофагов по отношению к различным микроорганизмам: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.

Важная роль в регуляции вне- и внутриклеточного уровня аденозинового обмена принадлежит 5'-нуклеотидазе — одному из основных эктоферментов пуринового обмена. Снижение уровня этого фермента, сопровождающее активацию макрофагов, рассматривается как проявление биохимических процессов, приводящих к понижению уровня аденозина — ингибитора функциональной активности клетки. Результаты исследований иммуномодуляторов из гидробионтов свидетельствуют о длительном и стойком снижении 5'-нуклеотидазы после парентерального введения их мышам, при этом степень снижения

коррелирует с иммуностимулирующей активностью препаратов [1, 23]. Поскольку 5'-нуклеотидаза осуществляет гидролиз циклического аденозинмонофосфата с образованием аденозина, физиологическое значение ферментативных изменений, наблюдаемых в макрофагах при введении биополимеров из гидробионтов, может быть связано со снижением уровня указанного соединения в клетках, что обуславливает их влияние на интенсивность гуморального и клеточного иммунитета.

Как показали наши исследования [3, 9], инкубирование макрофагов с биополимерами из морских гидробионтов обеспечивало усиление способности этих клеток к спонтанной продукции свободных радикалов. Интенсивность выработки активных форм кислорода зависела от используемого препарата, наибольшей активностью в этом случае обладали фукоидан и зостерин. Высокий уровень значимости различий был выявлен при инкубировании макрофагов с митиланом и тинростимом.

Одним из признаков активации макрофагов является усиление экспрессии мембранных рецепторов, в частности CR1- рецептора, обладающего высокой аффинностью к C3b компоненту комплемента, а также рецепторов для Fc-фрагмента IgG — FcγR. При исследовании экспрессии мембранных рецепторов макрофагов под действием БАВ из гидробионтов установлено, что макрофаги в присутствии исследуемых препаратов экспрессируют большее по сравнению с контролем количество FcγR и CR1 [12]. Связывание C3b и iC3b с рецепторами комплемента на поверхности фагоцитов может вызывать, кроме стимуляции фагоцитоза, экзоцитоз гранул, содержащих протеолитические ферменты, и образование свободных кислородных радикалов в результате вспышки клеточного дыхания. Основная функция FcR — индукция внеклеточной цитотоксичности и фагоцитоза опсонизированных микробов. В этой связи результаты, демонстрирующие усиление экспрессии FcγR и CR1 на макрофагах, соотносятся с полученными ранее данными о способности биополимеров усиливать микробицидную и поглотительную активность этих клеточных элементов [1].

БАВ гидробионтов усиливают фагоцитарную активность и число участвующих в фагоцитозе полиморфно-ядерных лейкоцитов по отношению как к грамположительным, так и к грамотрицательным микроорганизмам. В условиях экспериментального циклофосфатиндуцированного иммунодефицитного состояния полинуклеаров исследуемые биополимеры проявляли преимущественно иммунокорректирующие свойства, имеющие характер «модуляции с элементами стимуляции», восстанавливая нарушенные функции клеток [10, 11, 15].

Все исследованные БАВ в разной степени обладают адьювантным действием, в том числе восстанавливают гуморальный иммунный ответ у старых мышей и мышей с иммунодефицитом, усиливают

иммунный ответ на вакцины [3, 4, 16, 30]. Кроме того, все они усиливают клеточный ответ организма [3, 9, 14].

В ряде работ сотрудников НИИ ЭМ СО РАМН указывается на антиоксидантное [19, 23] и противовоспалительное [3, 4] действие БАВ из гидробионтов.

В результате проведения цикла работ [13, 25] было показано, что БАВ морских гидробионтов оказывают сходное действие на выработку цитокинов стимулированными и нестимулированными мононуклеарами крови человека. В их действии преобладает регуляторный эффект: исходно низкая продукция цитокинов усиливается, исходно высокая — снижается. Все исследованные БАВ модулируют продукцию провоспалительных цитокинов. Несмотря на стимуляцию образования этой группы цитокинов биологически активными веществами гидробионтов, введение их *in vivo* не сопровождается какими-либо нежелательными эффектами, характерными для парентерального введения фактора некроза опухоли-α или интерлейкина-1. Установлено модулирующее действие БАВ на образование противовоспалительных цитокинов [13].

Как известно, поиск высокоэффективных заменителей гепарина среди его структурных аналогов — сульфатированных полисахаридов растительного происхождения — не теряет своей актуальности в силу их большой доступности и безопасности. Установлено [23, 30], что фукоидан, выделенный из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens*, в коагуляционной тест-системе с очищенным фибриногеном не обладает антикоагулянтным действием без антитромбина III, а точным местом его антикоагулянтного действия в сложном каскаде системы свертывания крови является тромбин. Показано, что антикоагулянтная активность фукоидана обусловлена инактивацией тромбина, которая значима и сопоставима с антикоагулянтной активностью гепарина. При этом инактивация не реализуется без антитромбина III. Именно таким кофакторным эффектом обладает и гепарин, что и показывает параллельное сравнительное исследование, где вместо фукоидана использовали гепарин [21, 22]. Таким образом, механизм антикоагулянтного действия изученного нами фукоидана отличается от такового у других фукоиданов из бурых водорослей [22]. Эти свойства, вероятно, связаны с особенностями его химической структуры: небольшой молекулярной массой, присутствием кроме фукозы в качестве основной структурной единицы других моносахаридных остатков, а также средней степени сульфатирования. Выгодно отличает фукоидан от гепарина его иммуномодулирующее, а также антимикробное действие [10, 11, 22].

Антикоагулянтное действие было установлено и для тинростима. Это свойство пептида обнаружено при его пероральном использовании в комплексном лечении бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких [20], одним из ключевых

звеньев патогенеза которых является система гемостаза. Патология этой системы проявляется внутрисосудистым свертыванием крови по типу латентного ДВС-синдрома, что требует специфического лечения с помощью препаратов, улучшающих реологические свойства крови. С этой целью в курс лечения хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмы был включен тинростим. Клинические наблюдения показали, что тинростим приводил к частичному купированию ДВС-синдрома и увеличению фибринолитического потенциала крови, что, в свою очередь, способствовало предотвращению процессов фиброза в бронхиальном дереве [3,4, 20]. При этом прямого влияния тинростима непосредственно на плазменные факторы свертывания крови и фибринолиза, как это имело место при использовании фукоидана, в опытах *in vitro* не наблюдалось. Вероятно, влияние тинростима на гемостаз осуществляется опосредованно через иммунную систему.

Нарушение процессов кроветворения является практически постоянным спутником иммунодефицитных состояний. В этой связи одной из задач эффективной патогенетической терапии и профилактики иммуногематологических расстройств является использование иммуномодуляторов, способных стимулировать кроветворение на уровне ранних костно-мозговых предшественников. Наши исследования показали, что полисахаридосодержащие вещества гидробактериоцитов при кратковременном контакте выводят СКК из фазы покоя в S-фазу клеточного цикла с последующей клеточной репликацией [2, 14–16, 25, 28]. Наиболее эффективным в этом плане оказался транслам [17]. В связи с этим он был применен для профилактики и лечения экспериментальной острой лучевой болезни. При профилактическом введении глюкан защищал от гибели 25% мышей при дозе облучения 7,7 Гр. Продолжительность жизни животных увеличивалась почти в два раза. Более значительный эффект получен при введении транслама после облучения. При подкожном и внутривенном введении препарат защищал 70–75% мышей. В опытах на собаках применение препарата в первые 24 часа после радиационного воздействия позволило предупреждать гибель 40–60% животных при 6–10% выживаемости в контроле. Благоприятный терапевтический эффект и хорошая переносимость транслама установлены на обезьянах *Macaca fascicularis*, облученных в дозе 5 Гр (эксперименты проводили на базе Института биофизики РАН, г. Москва). Сочетанное применение транслама и антибиотиков способствовало увеличению выживаемости животных на 20–50% и значительному ослаблению тяжести лучевого поражения. По признанию ученых Института биофизики, существенным преимуществом транслама перед другими средствами раннего лечения острой лучевой болезни является его большая терапевтическая широта, отсутствие токсичности, хорошая растворимость,

переносимость, отсутствие видимой клинической реакции на введение в малой, но эффективной дозе. Таким образом, коллективом дальневосточных ученых получен и изучен новый препарат, который по совокупности химических свойств, биологического и противолучевого действия имеет реальные перспективы клинического применения в качестве средства раннего лечения лучевой болезни. Близкие к описанным результаты получены при изучении радиоэлитного действия ДНК из молок лососевых рыб [25, 28].

Следует упомянуть также интересные исследования противоопухолевой и антиоксидантной активности БАВ из гидробактериоцитов [14].

Адгезия патогенных микроорганизмов является начальным этапом развития инфекционного процесса. Известно, что моно-, олиго- и полисахариды препятствуют адгезии микроорганизмов на эпителиальных клетках. Учеными НИИ ЭМ СО РАМН исследована антиадгезивная активность полисахаридов из морских протеобактерий рода *Pseudoalteromonas*. Установлено, что кислый капсульный и кислые клеточные полисахариды, выделенные из различных видов морских микроорганизмов рода *Pseudoalteromonas*, обладают способностью блокировать адгезию возбудителей псевдотуберкулеза и дифтерии на эритроцитах барана и человека, а также на клетках буккального эпителия.

Дальнейшие исследования блокирования адгезии патогенных микроорганизмов, в том числе вирусов, на эукариотических клетках с помощью биогликанов морских бактерий очень перспективны, так как позволяют изучать строение бактериальных адгезинов и рецепторов к ним на клетках-мишенях, а также использовать вещества-ингибиторы адгезии для предотвращения колонизации тканей — начального этапа инфекционного процесса.

В процессе работы было получено 25 патентов и авторских свидетельств, опубликовано более 200 статей в российской и зарубежной печати, защищено 16 кандидатских диссертаций, подготовлена к защите одна докторская диссертация, изданы 2 монографии.

В условиях клиники была показана эффективность тинростима при включении его в курс лечения таких болезней, как хроническая обструктивная болезнь легких [24], бронхиальная астма [20], гонорея [27], хламидийная инфекция [29] и др. На основе тинростима и ДНК были изготовлены молочные и мясные продукты, способы получения которых защищены патентами, исследована их иммунологическая активность, разработана и утверждена технологическая документация [3]. Запатентована композиция для профилактики и лечения гриппа и острых респираторных заболеваний [30].

Таким образом, сотрудниками НИИЭМ СО РАМН в совместных исследованиях с учеными ТИБОХ ДВО РАН и ТИПРО-центра получены и изучены БАВ, которые могут стать основой для создания новых

эффективных лекарственных препаратов и парафармацевтических средств.

Литература

1. Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С., Оводова Р.Г. и др. // *Антибиотики*. - 1984. - №9. - С. 38-41.
2. Беседнова Н.Н., Иванушко Л.А., Звягинцева Т.Н., Елякова Л.А. // *Антибиотики и химиотерапия*. - 2000. - С. 3-11.
3. Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. *Иммунотропные пептиды из гидробионтов и наземных животных*. - Владивосток : Изд-во ТИНРО-центра, 2004.
4. Беседнова Н.Н., Эпштейн Л.М. *Дезоксирибонуклеиновая кислота*. - Владивосток : Изд-во ТИНРО-центра, 2003.
5. Гажя А.К. *Иммуноактивный пептид из оптических ганглиев кальмара* : дис.... канд. мед. наук. - Владивосток, 1994.
6. Запорожец Т.С. *Иммуностимулирующая активность биогликанов морских беспозвоночных* : автореф. дис.... канд. мед. наук. - М., 1986.
7. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Оводова Р.Г., Гладкова В.И. // *Журн. микробиол.* - 1994. - № 3. - С. 86-88.
8. Запорожец Т.С., Макаренко И.Д., Гажя А.К. и др. // *Мед. иммунол.* - 2003. - № 2. - С. 149-156.
9. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Звягинцева Т.Н., Молчанова В.Н. // *Антибиотики и химиотерапия*. - 2003. - №7. - С. 6-10.
10. Запорожец Т.С., Макаренко И.Д., Гажя А.К. и др. // *Мед. иммунол.* - 2003. - № 2. - С. 149-156.
11. Запорожец Т.С. // *Антибиотики и химиотерапия*. - 2003. - №9. - С. 3-7.
12. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Звягинцева Т.Н., Молчанова В.Н. // *Антибиотики и химиотерапия*. - 2003. - №3. - С. 17-20.
13. Запорожец Т.С., Иванушко Л.А., Звягинцева Т.Н. и др. // *Мед. иммунол.* - 2004. - № 1-2. - С. 89-96.
14. Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н., Елякова Л.А. *Структура и иммунотропное действие 1->3:1,6->6-β-D-глюканов*. - Владивосток, 2002.
15. Иванушко Л.А., Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С., Звягинцева Т.Н. // *Антибиотики и химиотерапия*. - 2000. - №7. - С. 46-49.
16. Иванушко Л.А., Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С., Звягинцева Т.Н. // *Антибиотики и химиотерапия*. - 2001. - №7. - С. 22-26.
17. Иенатенко Л.А. *Иммуномодулирующие и радиозащитные свойства транслама* : автореф. дис.... канд. мед. наук. - Владивосток, 1994.
18. Крылова Н.В. *Химиотерапевтические и иммуномодулирующие свойства глюкана из *Srenomytilus gaja* при экспериментальных инъекциях* : дис. ... канд. биол. наук. - Владивосток, 1986.
19. Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Иванушко Л.А., Оводова Р.Г. // *Новые биомедицинские технологии с использованием БАД*. - Владивосток, 1998. - С. 81-83.
20. Кузнецова Т.А., Суханова Г.И., Яковец Л.И., Эпштейн Л.М. // *Тихоокеанский. мед. журн.* - 1999. - № 3. - С. 90.
21. Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Мамаев А.Н. и др. // *Бюлл. эксп. биол. и мед.* - 2003. - Т. 136, № 11. - С. 35-39.
22. Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. и др. // *Антибиотики и химиотерапия*. - 2003. - №4. - С. 11-13.
23. Логвиненко А.А. *Влияние термостабильного токсина *Y. pseudotuberculosis* на иммунную систему (экспериментальные исследования)* : дис. ... канд. мед. наук. - Владивосток, 2000.
24. Петраковская В.А. *Оценка диагностической значимости компьютерной дермографии и эффективности применения тинростима у больных хронической обструктивной болезнью легких* : автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Владивосток, 2003.
25. Потапова В.В. *Иммуномодулирующие и радиозащитные свойства биологически активных веществ из морских гидробионтов* : автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Владивосток, 2005.
26. Пушкарева Т.В. *Экспериментальное обоснование клинического применения тинростима при псевдотуберкулезной инфекции* : дис. ... канд. мед. наук. - Владивосток, 2004.
27. Сингур О.А. *Цитокиновое обеспечение фагоцитарной защиты и ее коррекция, микробиологические особенности хронической гонореи у мужчин* : автореф. дис.... канд. мед. наук. - Владивосток, 2003.
28. Федянина Л.Н., Потапова В.В., Эпштейн Л.М. и др. *Способ стимулирования колониеобразования кровяных клеток-предшественников в селезенке при облучении животных*. - Патент № 2230559 РФ от 20.06.04.
29. Ширинкина Н.В. *Факторы естественной резистентности, показатели иммунного ответа и тактика иммунокоррекции при экспериментальной хламидийной инфекции* : автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Пермь, 2003.
30. Эпштейн Л.М., Боровская Г.А., Левачев М.М. // *Вопр. питания*. - 1997. - №1. - С. 10-13.

Поступила в редакцию 28.04.06.

MODIFIERS OF THE BIOLOGICAL ANSWER OF THE ORGANISM FROM SEA HYDROBIONTS

N.N. Besednova, T.S. Zaporozhets
Scientific research institute of epidemiology and microbiology
Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Science
(Vladivostok)

Summary - Results of long-term researches of biologically active substances from hydrobionts of the Pacific Ocean, done in the institute of epidemiology and microbiology together with scientists of Pacific institute of bioorganic chemistry Far-Eastern branch of the Russian Academy of Science and Pacific research fishing center are presented. It's the brief review of works, devoted to the most active compounds (tinrostim, zosterin, translam, mitilan, fukoidan, salmon DNA) in which mechanisms of the action, creating preconditions for use of these substances as a basis for designing of medications and biologically active additives are explained.

Pacific Medical Journal, 2006, No. 3, p. 15-18.