

УДК 616.831-002-085.281.8:577.144:582.272

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КЛЕЩЕВОМ ЭНЦЕФАЛИТЕ: СВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ

И.Д. Макаренкова¹, Г.Н. Леонова¹, О.С. Майстровская¹, Т.Н. Звягинцева², Т.И. Имбс², С.П. Ермакова², Н.Н. Беседнова¹

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)

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, фукоиданы, эксперимент.

Проведено сравнительное изучение противовирусной активности сульфатированных полисахаридов – фукоиданов из бурых водорослей *Laminaria japonica*, *Laminaria cichorioides*, *Fucus evanescens* и *Costaria costata* на культуре клеток СПЭВ, инфицированных вирусом клещевого энцефалита. Установлено, что фукоиданы обладают вирулицидным действием в отношении высокопатогенного штамма вируса клещевого энцефалита, а также способностью подавлять адсорбцию и репликацию вируса на ранних стадиях развития инфекции *in vitro*.

Невысокая эффективность традиционных методов терапии клещевого энцефалита (КЭ) и способность вируса длительное время сохраняться в клетках центральной нервной системы даже после адекватного лечения острых форм заболевания диктует необходимость поиска новых препаратов, не только способствующих регуляции функций иммунной системы, но и избирательно воздействующих на процессы репликации вируса.

В настоящее время ведется интенсивная работа по созданию и изучению нового класса иммунобиологических препаратов – модификаторов функций врожденного иммунитета при инфекционных заболеваниях [7, 11]. Большой интерес в рамках этого направления представляют сульфатированные полисахариды – фукоиданы из бурых водорослей, содержащие уникальные химические соединения и обладающие выраженной иммуномодулирующей, противовирусной, антикоагулянтной, противовоспалительной, противоопухолевой и антибактериальной активностью [1–3, 9, 14].

Согласно данным литературы и нашим исследованиям, фукоиданы являются агонистами системы врожденного иммунитета, а также обладают выраженной противовирусной активностью в отношении возбудителей иммунодефицита человека, простого герпеса, цитомегалии, гриппа птиц и геморрагической лихорадки с почечным синдромом [1, 3, 4, 10, 12, 13]. Кроме того, в ряде работ установлено, что противовирусное действие фукоиданов зависит от метода экстрагирования, структуры, молекулярной массы, степени сульфатирования и моносахаридного состава [9, 12].

Цель настоящей работы – сравнительный анализ противовирусной активности сульфатированных полисахаридов из различных видов бурых водорослей в отношении вируса клещевого энцефалита *in vitro*.

Макаренкова Илона Дамировна – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИЭМ СО РАМН; e-mail: ilona_m@mail.ru

Материал и методы. В работе использовали штамм Primorye-73 вируса КЭ дальневосточного субтипа, выделенный из мозга пациента, умершего от очаговой формы инфекции (инфекционный титр 10^7 ТЦИД₅₀/0,2 мл). Клетки культивировали на перевиваемой культуре клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) в 24-луночных пластиковых панелях с ростовой средой (равное соотношение сред 199 и RPMI), с добавлением 10 % сыворотки эмбрионов коров и 100 ЕД/мл гентамицина. Поддерживающая среда содержала 1 % эмбриональной сыворотки.

Выделение и изучение химического состава и структуры фукоиданов из бурых водорослей проведено в ТИБОХ ДВО РАН:

1. Фукоидан из *Laminaria japonica* – частично ацетилированный галактофукан (Fuc:Gal:Man:Rha – 1:0,3:0,1:0,06), сульфатированный преимущественно по положению С-4 остатков фукозы [14];

2. Фукоидан из *Laminaria cichorioides* – высокосульфатированный 1→3-а-L-фукан (Fuc:Gal:Man – 1:0,09:0,08); соотношение фукозы и сульфатов – 1:1,7 [14];

3. Фукоидан из *Fucus evanescens* – частично ацетилированный 1→3;1→4-а-L-фукан (Fuc:Gal:Xyl:Man – 1:0,12:0,14:0,11), сульфатированный преимущественно по С-2 положению остатков фукозы; соотношение фукозы и сульфатов – 1:0,9 [8, 14].

4. Фукоидан из *Costaria costata* – частично ацетилированный галактофукан (Fuc:Gal:Man:Rha – 1:0,29:0,08:0,06), сульфатированный преимущественно по С-4 положению остатков фукозы и, в меньшей степени, по С-2 положению остатков фукозы и галактозы [2].

Для анализа вирулицидного действия фукоиданы в концентрации 100, 500 и 1000 мкг/мл соединяли с вирусосодержащим материалом (в соотношении 1:1) и инкубировали в течение 1 часа при температуре 23–25 °С. Далее 10-кратными разведениями экспериментальных проб заражали монослой культуры клеток СПЭВ и инкубировали 1 час в термостате при 37 °С. Затем инокулят сливали, клетки однократно отмывали, добавляли поддерживающую среду и инкубировали в течение 5 суток при 37 °С в CO₂-инкубаторе.

Протективное действие препаратов изучали на культуре клеток СПЭВ, в которую вносили фукоиданы (в концентрации 100, 500 и 1000 мкг/мл) и инкубировали в течение 1 часа при температуре 37 °С. Затем клеточный монослой однократно отмывали, вносили 10-кратные разведения вируса КЭ и для контакта

Таблица 1
Вирулицидное действие фукоиданов

Фукоиданы	Концентрация препарата, мкг/мл	Титр вируса КЭ (Δ , lg ТЦИД ₅₀ /мл) ¹	
		M±m	Me±SD
<i>L. japonica</i>	1000	0,6±0,3	1,0±0,5
	500	1,6±0,3	2,0±0,5
	100	3,3±0,3	3,0±0,5
<i>L. cichorioides</i>	1000	3,0±0,6	3,0±1,0
	500	3,3±0,3	3,0±0,5
	100	5,3±0,3 ²	5,0±0,5 ²
<i>F. evanescens</i>	1000	2,0±0,6	2,0±1,0
	500	1,6±0,3	2,0±0,5
	100	2,3±0,3	2,0±0,5
<i>C. costata</i>	1000	2,0±0,6	2,0±1,0
	500	2,3±0,3	2,0±0,5
	100	2,3±0,3	2,0±0,5
Контроль	–	6,3±0,3	6,0±0,5

¹Здесь и в табл. 2: M±m – средняя арифметическая и стандартная ошибка средней арифметической; Me±SD – медиана и среднее квадратичное отклонение от средней арифметической.

²Только по данной концентрации статистически значимой разницы по сравнению с контролем не получено.

Таблица 2
Протективное действие фукоиданов

Фукоиданы	Концентрация препарата, мкг/мл	Титр вируса КЭ (Δ , lg ТЦИД ₅₀ /мл) ¹	
		M±m	Me±SD
<i>L. japonica</i>	1000	2,0±0,5	2,0±1,0
	500	2,3±0,3	2,0±0,5
	100	4,0±0,5	4,0±1,0
<i>L. cichorioides</i>	1000	3,3±0,3	3,0±0,5
	500	3,3±0,3	3,0±0,5
	100	4,0±0,5	4,0±1,0
<i>F. evanescens</i>	1000	3,3±0,3	3,0±0,5
	500	2,0±0,0	2,0±0,0
	100	3,3±0,3	3,0±0,5
<i>C. costata</i>	1000	3,6±0,3	4,0±0,5
	500	4,0±0,0	4,0±0,0
	100	4,3±0,3	4,0±0,5
Контроль	–	6,3±0,3	6,0±0,5

¹Разница с контролем по всем концентрациям фукоиданов статистически значима.

помещали на 1 час в термостат при температуре 37 °С. После инкубации инокулят сливали, клетки однократно отмывали от вируса, вносили поддерживающую среду. Планшеты с экспериментальными пробами помещали в 5% CO₂-инкубатор на 5 суток.

При проведении экспериментов параллельно заражали монослой клеток СПЭВ 10-кратным разведением вируса (контроль опыта). Противовирусный эффект препаратов рассчитывали по соотношению инфекционной активности возбудителя в опытных и контрольных образцах. Для получения статистически достоверных результатов эксперименты проводили трижды. Критерием оценки эффективности

вирусингибирующего действия препаратов *in vitro*, согласно требованиям Фармгоскомитета РФ, являлся показатель снижения инфекционного титра вируса (Δ), который должен составлять не менее 1,78 lg [6].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием прикладного пакета Statistica 7.

Результаты исследования. Сравнительное изучение эффективности показало, что все образцы обладали противовирусной активностью, но в разной степени подавляли цитопатогенное действие вируса КЭ. При предварительной экспозиции с фукоиданом из *L. japonica* во всех концентрациях и из *L. cichorioides* в концентрациях 1000 и 500 мкг/мл титр вируса снижался (фукоидан из *L. cichorioides* в концентрации 100 мкг/мл практически не оказывал вирусингибирующего действия). При предварительной экспозиции вируса с фукоиданами из *F. evanescens* и *C. costata* было установлено, что препараты во всех концентрациях способствовали снижению титра вируса в среднем на 4 lg (табл. 1).

Применение фукоиданов в разных концентрациях также вело к статистически и биологически ($\Delta > 2$ lg) значимому подавлению цитопатического действия и накопления вируса, но в меньшей степени, чем при изучении вирулицидного эффекта препаратов. Так, предварительная обработка клеток СПЭВ фукоиданом из *L. japonica* в концентрации 1000 и 500 мкг/мл способствовала их защите от цитодеструктивного действия, снижая титр вируса в среднем на 4 lg, а в концентрации 100 мкг/мл – на 2 lg по сравнению с контролем. Предварительная обработка клеток фукоиданом из *L. cichorioides* в концентрации 1000 и 500 мкг/мл способствовала снижению титра вируса на 3 lg, а в концентрации 100 мкг/мл – на 2 lg, тогда как предварительная экспозиция клеток СПЭВ с фукоиданом из *F. evanescens* в концентрации 1000 и 100 мкг/мл снижала титр вируса на 3 lg, а в дозе 500 мкг/мл – на 4 lg. При исследовании протективного действия фукоидана из водоросли *C. costata* установлено, что препарат во всех исследуемых концентрациях подавлял цитопатическое действие вируса КЭ на 2 lg (табл. 2).

Обсуждение полученных данных. Изучение противовирусного действия сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей *L. japonica*, *L. cichorioides*, *F. evanescens* и *C. costata* на культуре клеток СПЭВ, инфицированных высокопатогенным штаммом вируса КЭ, показало, что фукоиданы обладают вирулицидным и протективным действием при использовании этой чувствительной к вирусу модели. Тем не менее следует отметить, что наибольшим противовирусным действием в отношении вируса КЭ обладают частично ацетилированные, с низким содержанием сульфатов фукоиданы из *F. evanescens*, *L. japonica* и *C. costata*, тогда как высокосульфатированный фукоидан из *L. cichorioides* обладал менее выраженной противовирусной активностью. По-видимому, проявление биологической активности фукоиданов определяется не только степенью сульфатирования, но может зависеть и от содержания фрагментов определенной структуры. Так,

фукоиданы из *L. japonica* и *C. costata* являются галактофукуканами [2, 14]. Фукоиданы из *F. evanescens* и *L. cichorioides* представляют собой практически чистые α -L-фуканы, но различаются по содержанию моносахаридов и структуре главной цепи молекул. Основным элементом молекулы частично ацетилированного фукоидана из *F. evanescens* является последовательность, построенная из чередующихся 1 \rightarrow 3- и 1 \rightarrow 4-связанных остатков α -L-фукопиранозы, а главная цепь фукоидана из *L. cichorioides* построена только из 1 \rightarrow 3 связанных остатков α -L-фукопиранозы [8, 14]. Возможно, высокая степень сульфатирования, отсутствие ацетатов и 1 \rightarrow 4-связанных остатков α -L-фукопиранозы уменьшают антивирусное действие фукоидана из *L. cichorioides*.

Известно, что клеточными рецепторами для вируса КЭ являются гликопротеины, гепарансульфаты и ламининсвязывающий белок, а за адсорбцию и последующую репликацию вируса отвечает экспонированный на поверхности вирионов гликопротеин E [5]. Одним из важнейших требований к противовирусным препаратам является создание защиты от цитодеструктивного действия. Мы предполагаем, что сульфатированные полисахариды, так же как и гепарансульфаты, могут являться одними из ко-рецепторов для вируса КЭ, в связи с чем противовирусная активность фукоиданов может быть обусловлена ингибированием адсорбции и последующей репликации вирусов в клетках за счет конкурентного лиганд-рецепторного взаимодействия с гликопротеином вируса, что препятствует слиянию клеточной и вирусной мембран и способствует созданию защиты клеток.

Кроме того, ранее нами было показано, что сульфатированные полисахариды являются активаторами системы врожденного иммунитета, о чем свидетельствует увеличение экспрессии поверхностных адгезивных, антигенпредставляющих, костимулирующих молекул и толл-подобных рецепторов на дендритных клетках. В свою очередь повышение синтеза и секреции провоспалительных и регуляторного цитокинов способствует активации нейтрофилов, макрофагов и натуральных киллеров, усилению фагоцитоза, пролиферации лимфоцитов и увеличению синтеза интерферона- γ натуральными киллерами, тем самым обеспечивая их участие в антиинфекционной защите организма [1, 3].

Таким образом, широкий биологический спектр действия сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей, а также полученные нами результаты открывают перспективу для изучения фукоиданов в качестве потенциальных модификаторов биологического ответа при вирусных инфекциях и для дальнейшего их применения в комплексном лечении наряду с официальными препаратами.

Литература

1. Запорожец Т.С. Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия биополимеров морских гидробионтов: дис. ... д-ра мед. наук. Владивосток, 2006. 352 с.
2. Имбс Т.И., Шевченко Н.М., Суховерхов С.В. и др. Влияние сезона сбора на состав и структурные характеристики полисахаридов бурой водоросли *Costaria costata* // Химия

- природных соединений. 2009. № 6. С. 661–665.
3. Макаренкова И.Д., Ахматова Н.К., Семенова И.Б. и др. Продукция цитокинов дендритными клетками костного мозга мыши под воздействием сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей // ЖМЭИ. 2010. № 5. С. 34–39.
 4. Макаренкова И. Д., Дерябин П. Г., Львов Д. К. и др. Противовирусная активность сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Laminaria japonica* в отношении инфекции культур клеток, вызванной вирусом гриппа А птиц (H5N1) // Вopr. вирусол. 2010. № 1. С. 41–45.
 5. Романова Л.Ю., Гмыль Л.В. Локтев В.Б. и др. Изменение антигенной структуры поверхностного гликопротеина E вируса клещевого энцефалита при его адаптации к клещам и млекопитающим // Вopr. вирусол. 2006. № 6. С. 31–34.
 6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. П.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. 832 с.
 7. Семенов Б.Ф. Зверев В.В. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов // Журн. микробиол. 2007. № 4. С.93–100.
 8. Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L. et al. Structural analysis of fucoidan from brown algae *Fucus evanescens* by MALDI-TOF and tandem ESI mass-spectrometry // Carbohydr. Res. 2009. Vol. 344. P. 779–787.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Gearing A.J. Targeting toll-like receptors for drug development: a summary of commercial approaches // Immunol. Cell. Biol. 2007. Vol. 85, No. 6. P. 490–494.
 12. 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.
 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, No. 1. P. 1–13.

Поступила в редакцию 23.03.2011.

ANTIVIRAL EFFECT OF BROWN ALGAE-DERIVED SULPHATED POLYSACCHARIDES IN CASE OF EXPERIMENTAL TICK-BORNE ENCEPHALITIS: TYING STRUCTURE AND FUNCTION

I.D. Makarenkova¹, G.N. Leonova¹, O.S. Maistrovskaya¹, T.N. Zvyagintseva², T.I. Imbs², S.P. Ermakova², N.N. Besednova¹
¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), ²Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia)

Summary – The authors have conducted comparable studies of antiviral effect of sulphated polysaccharides – fucoidans derived from brown algae *Laminaria japonica*, *Laminaria cichorioides*, *Fucus evanescens* and *Costaria costata* on the SPEV biocytoculture infected with tick-borne encephalitis virus. As reported, the fucoidans are known for virucidal effect against the high pathogenic strain of tick-borne encephalitis virus and capacity of suppressing virus adsorption and replication at early disease stages *in vitro*.

Key words: tick-borne encephalitis virus, fucoidans, experiment.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 44–46.