

Работа выполнена при финансовой поддержке Национального фонда NSFC-31071612, NSFC-21075012, Научного фонда Чжандзаде 2010ZD019 и Научного фонда провинции Хунань 2010FJ6096.

#### Литература

1. Корякова А.Г., Хоменко А.В., Лукьянов П.А. Роль сурфактантного протеина А в векторной доставке липосом к клеткам // Биологические мембраны. 2001. Т. 18, № 2. С. 131–136.
2. Batista I., Ramos C., Coutinho J., Bandarra N.M., Nunes M.L. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced // Process Biochemistry. 2010. Vol. 45. P. 18–24.
3. Jao C.L., Ko W.C. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from Tuna cooking juice // Fisheries Science. 2002. Vol. 68. P. 430–435.
4. Kong L., Wu X., Luo B. et al. Glycopeptides isolated from skin glands secretion of *Andrias davidianus* // Glycobiology. 2010. Vol. 20. P. 1503–1509.
5. Lan S., Li D., Jiang J. Call and skin glands secretion induced by stimulation of midbrain in urodele (*Andrias davidianus*) // Brain Research. 1990. Vol. 528. P. 159–161.
6. Singh N., Rajini P.S. Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel // Food Chemistry. 2004. Vol. 85. P. 611–616.

Поступила в редакцию 25.03.2011.

#### ANTIOXIDANT PROPERTIES OF CHINESE GIANT SALAMANDER SKIN SECRETION GLYCOPEPTIDES

W. Li<sup>1</sup>, M. Qu<sup>2</sup>, Ch. Tong<sup>3</sup>, Q. Jin<sup>1</sup>, X. Yu<sup>1</sup>, W. Wang<sup>1</sup>, P.A. Lukyanov<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dalian Ocean University (Dalian Liaoning 116023 China),

<sup>2</sup>Shenyang Agriculture University (Dalian Liaoning 116023 China),

<sup>3</sup>Northeast Forestry University (Harbin Heilongjiang 150040

China), <sup>4</sup>Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far East Branch of Russian Academy of Science (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia)

**Summary** – The skin secretion of the Chinese giant salamander *Andrias davidianus* protects the animal from unfavourable environmental conditions, thus ensuring antioxidative resistance and protection from ultraviolet light. It prevents from bacterial infections and has a vulnerary effect. The glycopeptides with molecular weight of 3.5 kDa and lower have been extracted from the Chinese giant salamander skin secretion. These are known to be resistant to 0.1 N of hydrochloric acid, trypsin and pepsin, easy to penetrate the intestinal wall. The glycopeptides have evident antioxidant properties, normalize nitroxide synthase activity of human peripheral blood, and suppress hyperproduction of reactive oxygen forms. It is very promising to treat oxidant stress.

**Key words:** Chinese giant salamander, glycopeptides, antioxidant properties.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 57–59.

УДК 577.114:612.112.91/94:95:612.017.11

## ГЛИКОПОЛИМЕРЫ МОРСКИХ ПРОТЕОБАКТЕРИЙ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АКТИВАТОРЫ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЧЕЛОВЕКА

Т.П. Смолина<sup>1</sup>, Т.А. Кузнецова<sup>1</sup>, Е.Л. Назаренко<sup>2</sup>, Н.Н. Беседнова<sup>1</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)

**Ключевые слова:** лимфоциты, липополисахарид протеобактерий, моноциты, нейтрофилы.

Показано влияние липополисахарида (ЛПС), выделенного из морских протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* штамма КММ156, и его структурных компонентов на активацию нейтрофилов, моноцитов и натуральных киллеров крови человека. Активацию клеток оценивали по изменению уровня экспрессии мембранных кластеров дифференцировки (CD) на поверхности натуральных киллеров (CD69 и CD25), на мембранах моноцитов и нейтрофилов (CD14 и CD16). ЛПС и его безлипидные компоненты оказывали активирующее действие на клеточное звено врожденного иммунитета. ЛПС вызывал шеддинг мембранных молекул CD14 с моноцитов и, по сравнению с контролем, значительно увеличивал популяцию клеток CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> с высоким уровнем эффекторных свойств и большим потенциалом антигенпредставляющей активности. О-специфический полисахарид и олигосахарид кора увеличивали популяцию моноцитов CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> в меньшей степени. Все гликополимеры, увеличивая экспрессию сигнальных молекул (CD14) и иммуноглобулинов (CD16) на нейтрофилах, приводили клетки к состоянию активации. На натуральных киллерах ЛПС в большей степени увеличивал экспрессию CD25 (пролиферативный потенциал клеток), а О-специфический полисахарид и олигосахарид кора – экспрессию CD69 (маркер цитотоксических функций).

Липополисахариды бактерий – сильные активаторы врожденного иммунитета – содержат токсический

компонент – липид А, что ограничивает их использование в качестве основы для получения лекарственных препаратов. В этом плане большой интерес представляют морские бактерии, относящиеся к роду *Pseudoalteromonas*, которые в силу особых условий обитания могут синтезировать необычные структурные варианты липида А с низким эндотоксическим потенциалом [3].

К настоящему времени биологически активные вещества, принадлежащие к различным классам соединений, обнаружены во многих видах морских бактерий рода *Pseudoalteromonas*. Установлено, что в состав гликополимеров внешней мембраны грамотрицательных морских бактерий *Pseudoalteromonas* входят редкие и необычные N-ациламино- и кислые моносахариды, а также высшие сахара [1]. Ранее нами было установлено, что кислые капсульный и клеточные полисахариды морских микроорганизмов этого рода обладают способностью блокировать адгезию патогенных микроорганизмов на клетках животных и человека [5], а липополисахарид (ЛПС) и его компоненты, выделенные из бактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, оказывают активирующее действие на мононуклеары клеток крови [6].

Цель настоящей работы – определение возможности активации клеток врожденного иммунитета

Смолина Татьяна Павловна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии НИИЭМ СО РАМН; тел.: +7 (423) 244-24-46, e-mail: tsmol@mail.ru

человека ЛПС *P. nigrifaciens*, а также его безлипидными компонентами: О-специфическим полисахаридом (О-ПС) и олигосахаридом кора (ОК). Для этого на основе анализа кластеров дифференцировки (CD – Cluster of Differentiation) на моноцитах и нейтрофилах измеряли уровень экспрессии рецепторов, участвующих в проведении активационного сигнала внутрь клетки (CD14 – рецептор к ЛПС) и запускающих различные механизмы клеточного ответа (CD16 – рецептор для Fc-фрагмента иммуноглобулина G). Среди натуральных киллеров определяли процент клеток, характеризующихся цитотоксическими свойствами (CD69<sup>+</sup>) и пролиферативным потенциалом (CD25<sup>+</sup>).

**Материал и методы.** Гликополимеры получены из штамма *P. nigrifaciens* КММ 156, выделенного из ткани желудка дальневосточного двустворчатого моллюска *Crenomytilus grayanus* (бухта Троица) и находящегося в коллекции морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН. О-ПС, входящий в состав ЛПС, имеет идентичное строение с капсульным полисахаридом и состоит из тетрасахаридных повторяющихся звеньев, содержащих два остатка L-рамнозы, один остаток 2-ацетидамо-2-дезоксид-глюкозы и один остаток 3-O-[(R)-1-карбоксиил]-D-глюкозы (глюколактиловой кислоты) [2]. В состав ЛПС кроме О-ПС входит липид А в аномально низком количестве и ОК.

Материалом для исследования служила периферическая кровь с гепарином (25 БД/мл), полученная от здоровых доноров. Исследуемые гликополимеры растворяли в физиологическом растворе и вносили в кровь в конечной концентрации 100 мкг/мл (оптимальную дозу определили в предварительных экспериментах). В контрольные пробы вносили физиологический раствор в равном объеме.

Уровень экспрессии молекул определяли методом двуцветного цитометрического анализа в программе Cell Quest на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson) с использованием моноклональных антител к молекулам CD45-FITC/CD14-PE, CD16-FITC, CD14-FITC, CD69-PE, CD25-PE (Beckman Coulter) и соответствующих изотипических контролей. Гейтирование субпопуляций нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов осуществляли по прямому и боковому светорассеянию, натуральных киллеров – по CD16. В каждой пробе анализировали не менее 10<sup>4</sup> клеток.

Экспрессию активационных маркеров CD69 определяли на поверхности натуральных киллеров через 1, 4 и 24 часа, экспрессию CD25 – через 24 часа. Уровень экспрессии CD16 на моноцитах оценивали через 4 часа. Результаты представлены как процент клеток, экспрессирующих соответствующие маркеры. Интенсивность экспрессии мембранных антигенов CD14 и CD16 на поверхности нейтрофилов и CD14 на моноцитах оценивали через 1 и 4 часа. Результаты, характеризующие количество молекул на поверхности клеток, показаны в виде средних интенсивностей

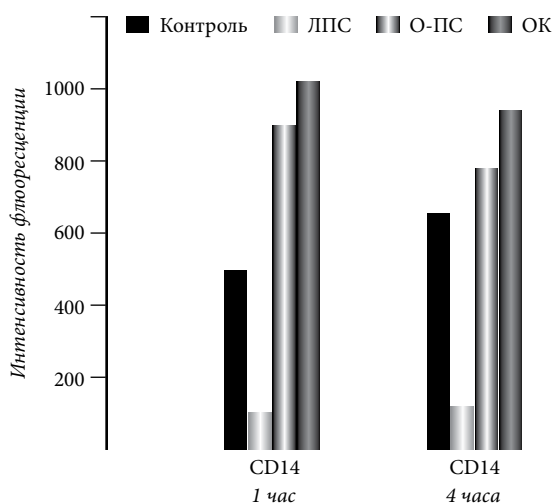


Рис. 1. Влияние гликополимеров, выделенных из *P. nigrifaciens*, на экспрессию CD14 моноцитами.

флуоресценции, из которых вычтены аналогичные показатели изотипического контроля.

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием пакета компьютерных программ Geostat, которые включали расчет медианы и квартильного размаха (разность значений 75-го и 25-го процентилей), а также оценку различий с использованием критерия Вилкоксона для связанных групп [4].

**Результаты исследования.** При изучении влияния на экспрессию CD14 на моноцитах было установлено значительное снижение числа этих молекул под действием ЛПС в течение 1-го часа инкубации: интенсивность флуоресценции CD14 была равна 108 усл.ед. (90–116 усл.ед.), в контроле – 489 усл.ед. (465–501 усл.ед.), через 4 часа этот показатель увеличивался до 130 усл.ед. (122–143 усл.ед.). Противоположный характер изменения экспрессии CD14 вызывали О-ПС и ОК: выраженная флуоресценция в течение 1-го часа инкубации – О-ПС – 890 усл.ед. (874–911 усл.ед.), ОК – 1039 усл.ед. (1018–1052 усл.ед.) – к 4-му часу начинала снижаться (рис. 1).

Все гликополимеры увеличивали минорную популяцию моноцитов, экспрессирующих CD16 и слабо экспрессирующих CD14 (рис. 1). Наибольший эффект оказывал ЛПС, повышавший количество моноцитов CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> до 47,7 % (40,2–51,6 %) при 7,4 % (6,2–8,4 %) в контроле, в то время как О-ПС увеличивал эту популяцию до 20,5 % (17,6–24,4 %), а ОК – до 19,9 % (16,2–21,7 %).

Экспрессия молекул CD14 на нейтрофилах под действием ЛПС носила двухфазный характер: снижение интенсивности флуоресценции CD14 через 1 час до 1,8 усл.ед. (1,4–2,0 усл.ед.) при 6,0 усл.ед. (5,5–6,4 усл.ед.) в контроле и повышение ее через 4 часа культивирования до 3,3 усл.ед. (3,0–3,6 усл.ед.) при 6,0 усл.ед. (5,4–6,3 усл.ед.) в контроле (рис. 2). Компоненты ЛПС – О-ПС и ОК – напротив, значительно увеличивали интенсивность флуоресценции CD14 уже через 1 час контакта с нейтрофилами. Если уровень экспрессии CD14 под действием

О-ПС продолжал возрастать до 4 часов инкубации, то под действием ОК он оставался без изменений.

Все гликополимеры изменяли уровень экспрессии CD16 на нейтрофилах, увеличивая количество молекул на мембранах в течение первого часа культивирования на 40–50%. Дальнейшая инкубация с гликополимерами в течение 4 часов приводила к снижению количества этих рецепторов на мембранах нейтрофилов, наибольший эффект оказывал ЛПС (рис. 2).

Лимфоциты, в том числе натуральные киллеры, в интактном состоянии не экспрессируют CD69 [8]. В наших экспериментах после 1 часа культивирования уровень натуральных киллеров CD69<sup>+</sup> в контроле был невысоким: 5,41% (4,35–6,27%). Инкубация клеток крови с любым из гликополимеров в течение часа приводила к увеличению их количества: ЛПС – 11,91% (9,37–13,24%), О-ПС – 18,07% (15,68–20,25%); ОК – 18,36% (16,35–21,04%). В дальнейшем количество натуральных киллеров, экспрессирующих CD69, продолжало возрастать до конца срока наблюдения (рис. 3).

Все исследованные гликополимеры через 24 часа инкубации с клетками крови увеличивали экспрессию CD25 на натуральных киллерах. Количество этих клеток, экспрессировавших CD25 под действием ЛПС, достигало 49,73% (43,61–55,37%), в то время как О-ПС увеличивал этот показатель до 32,75% (27,32–36,45%), ОК – до 29,57% (24,87–33,56%) при контрольном значении – 4,55% (2,25–6,23%).

**Обсуждение полученных данных.** Как показали наши исследования, ЛПС *P. nigrifaciens* и его структурные компоненты изменяли экспрессию активационных и сигнальных молекул на мембранах нейтрофилов, моноцитов и натуральных киллеров крови, осуществляющих функции врожденного иммунитета. Одним из ключевых медиаторов, опосредующих провоспалительную активность ЛПС, является его рецептор на моноцитах – CD14. Связывание ЛПС и других бактериальных продуктов с этим рецептором и последующее формирование высокоаффинного рецепторного комплекса с толл-подобным рецептором-4 запускает процессы активации клеток и продукцию цитокинов, регулирует апоптоз, взаимодействие лейкоцитов и эндотелия. [13]. По данным литературы, ЛПС инициирует в клетке два процесса, связанных с изменением количества рецепторов CD14, которое регистрируется в первые часы воздействия: сшивание (шеддинг) молекул с мембран и транслокацию внутриклеточных молекул на поверхность клетки [11]. В зависимости от того, какой из процессов преобладает, наблюдается уменьшение или увеличение мембранных молекул и возрастание концентрации растворимых рецепторов CD14, играющих роль в транспортировке ЛПС к мембранам клеток. Результаты экспериментов выявили двухфазный характер изменения уровня экспрессии мембранных рецепторов CD14 на моноцитах под действием гликополимеров, причем если ЛПС в первый час инкубации снижал их количество, а в дальнейшем увеличивал, то О-ПС и ОК демонстрировали противоположный эффект.

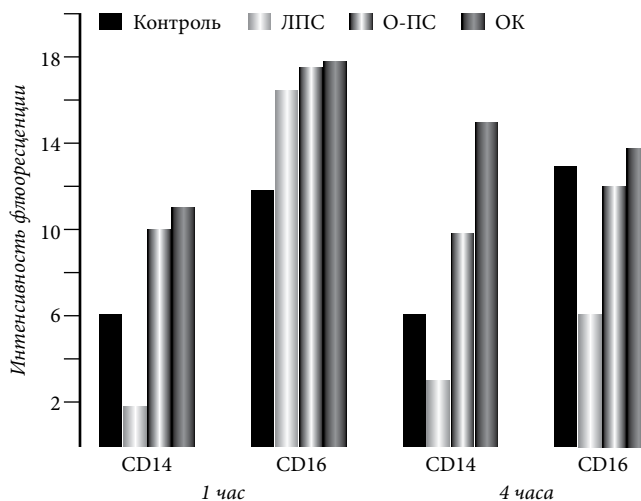


Рис. 2. Влияние гликополимеров, выделенных из *P. nigrifaciens*, на экспрессию CD14 и CD16 нейтрофилами.

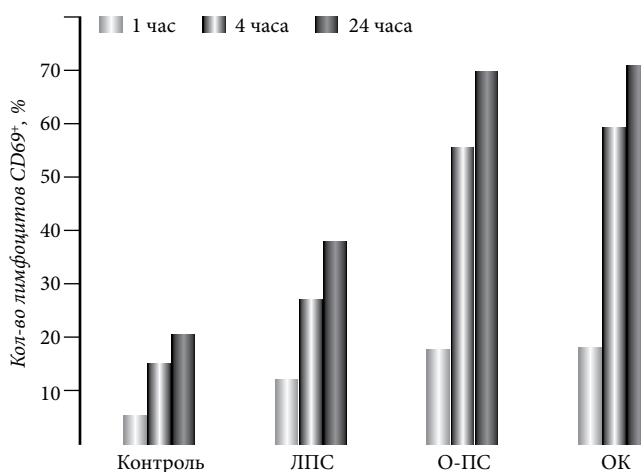


Рис. 3. Влияние гликополимеров, выделенных из *P. nigrifaciens*, на экспрессию CD69 натуральными киллерами.

На нейтрофилах, как и на моноцитах, ЛПС вызывал сначала снижение, а затем увеличение экспрессии молекул CD14, в то время как О-ПС и ОК с первого часа уровень их экспрессии увеличивали.

Все гликополимеры умножали популяцию моноцитов CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>, которая характеризуется более высокими уровнями фагоцитоза и продукции провоспалительных цитокинов, а также большим потенциалом антигенпредставляющей функции [10]. Наибольшим эффектом здесь обладал ЛПС. На основе различий экспрессии поверхностных молекул CD14 и CD16 у здорового человека идентифицированы две субпопуляции моноцитов: CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> (90–95%) и CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (5–10%). На моноцитах, принадлежащих к этим субпопуляциям, экспрессируются разные комбинации адгезионных молекул и рецепторов хемокинов, которые определяют различия во взаимодействии этих клеток с эндотелием и пути их миграции [10].

Все гликополимеры в течение первого часа культивирования увеличивали на мембранах нейтрофилов количество молекул CD16, которые могут играть важную роль в формировании иммунного ответа. Взаимодействие Fc-фрагмента иммуноглобулина G с циркулирующими

иммунными комплексами запускает различные механизмы клеточного ответа, включая активацию клеток, фагоцитоз, респираторный взрыв, антителозависимую клеточную цитотоксичность и секрецию провоспалительных медиаторов [7]. Дальнейшая инкубация с гликополимерами в течение 4 часов вызывала снижение количества рецепторов CD16 на мембранах нейтрофилов, вероятно, за счет шеддинга. Шеддинг молекул, наиболее выраженный в пробах с ЛПС, может свидетельствовать об апоптозе нейтрофилов [12] и увеличивать количество растворимых молекул CD16, которые осуществляют регуляторную функцию провоспалительных процессов, взаимодействуя с моноклеарами крови через рецепторы комплемента (CR3 и CR4) и индуцируя продукцию интерлейкинов 6 и 8 моноцитами [9].

CD69 не экспрессируется на покоящихся лимфоцитах, в том числе и на натуральных киллерах, но появляется после их активации в течение 1–2 часов после возбуждения. Увеличение уровня экспрессии CD69 на этих клетках (CD16<sup>+</sup>) индуцировали все исследованные гликополимеры, однако более значительный эффект наблюдался после воздействия О-ПС и ОК. Рецептор CD69 увеличивает цитотоксические свойства клеток, участвуя в лизисе, осуществляемом активированными натуральными киллерами [8].

Поскольку экспрессию CD25 принято считать маркером пролиферации [8], можно предположить, что ЛПС в большей степени увеличивает пролиферацию натуральных киллеров, в то время как его безлипидные фрагменты – О-ПС и ОК – эффекторную популяцию клеток CD69<sup>+</sup> с выраженными цитотоксическими свойствами.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ЛПС *P. nigrifaciens* штамма КММ156 и его безлипидные компоненты оказывают активирующее действие на клетки врожденного иммунитета. ЛПС в большей степени увеличивает эффекторные функции моноцитов и пролиферативный потенциал натуральных киллеров, инициирует апоптоз нейтрофилов. Безлипидные компоненты О-ПС и ОК, оказывая действие на все исследуемые клетки, в большей степени увеличивают субпопуляцию натуральных киллеров CD69<sup>+</sup>. В связи с этим представляется перспективным дальнейшее исследование этих гликополимеров для определения возможности использования их в качестве агонистов рецепторов врожденного иммунитета.

#### Литература

1. Горшкова Н.М. Таксономические критерии в систематике морских аэробных протеобактерий: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2000. 26 с.
2. Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л., Зубков А.А. и др. Структура повторяющегося звена кислого полисахарида *Alteromonas haloplanktis* КММ156 // *Биоорганическая химия*. 1993. Т. 19, № 3 С. 327–336.
3. Красикова И.Н., Капустина Н.В., Исаков В.В. и др. Установление структуры липида А из морской грамотрицательной бактерии *Pseudoalteromonas haloplanktis* ATCC 14393m // *Биоорганическая химия*. 2004. Т. 30, № 4. С. 409–416.
4. Смолин В.А. Математическое моделирование в геологии и геофизике (статистика). Владивосток: ДВГТУ, 2007. 232 с.

5. Смолина Т.П., Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л. и др. Блокирование адгезии *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью полисахаридов, выделенных из морских микроорганизмов *Pseudoalteromonas* // *Тихоокеанский мед. журн.* 2001. № 2. С. 18–20.
6. Смолина Т.П., Запорожец Т.С., Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л. Ранняя активация лимфоцитов и моноцитов периферической крови человека компонентами протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* // *Тихоокеанский мед. журн.* 2009, № 3. С. 45–48.
7. Brunkhorst B.A., Strohmeier G., Lazzari K. et al. Differential roles of Fc gamma RII and Fc gamma RIII in immune complex stimulation of human neutrophils // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267, No. 15. P. 20659–20666.
8. Frey E.A., Miller D.S., Jahr T.G. et al. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide // *J. Exp. Med.* 1992. Vol. 176. P. 1665–1671.
9. Galon J., Gauchat J.F., Mazieres N. et al. Soluble Fc gamma receptor type III (Fc gamma RIII, CD16) triggers cell activation through interaction with complement receptors // *J. Immunol.* 1996. Vol. 157. P. 1184–1192.
10. Grage-Griebenow E., Flad H. D., Ernst M. et al. Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates // *Immunobiology*. 2000. Vol. 202. P. 42–50.
11. Landmann R., Knopf H.-P., Link S. Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide // *Infection and immunity*. 1996. Vol. 64, No. 5. P. 1762–1769.
12. Moulding D.A., Hart C.A., Edwards S.W. Regulation of neutrophil Fc gamma RIIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate // *J. of Leukocyte Biology*. 1999. Vol. 65. P. 875–882.
13. Xia Y., Yamagata K., Krukoff T.L. Differential expression of the CD14/TLR4 complex and inflammatory signaling molecules following i.c.v. administration of LPS // *Brain Res.* 2006. Vol. 1095, No. 20. P. 85–95.

Поступила в редакцию 27.05.2011.

#### MARINE PROTEOBACTERIUM GLYCOPOLYMERS AS PROMISING ACTIVATORS OF HUMAN INNATE IMMUNITY CELLS

T.P. Smolina<sup>1</sup>, T.A. Kuznetsova<sup>1</sup>, E.L. Nazarenko<sup>2</sup>, N.N. Besednova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of RAMS (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia),

<sup>2</sup>Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of FEBRAS (159 100 Year Anniversary of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia)

**Summary** – The paper describes effects from lipopolysaccharide (LPS) extracted from marine proteo-bacterium *Pseudoalteromonas nigrifaciens* (strain КММ156) and its structural components on the ac-tivation of neutrophils, monocytes and natural killer cells in human blood. The cell activation was as-sessed by the changes in expression levels of membranous cluster differentiation (CD) on the natural killer cell surface (CD69 и CD25), membranes of monocytes and neutrophils (CD14 и CD16). The lipopolysaccharide and its and lipid-free components have activated the innate immunity cells. The lipopolysaccharide caused shedding of membrane molecules CD14 with monocytes and, compared to the control group, considerably increased CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> cell population with a number of effector properties and a great potential for antigen-presenting activity. O-Specific Polysaccharide and core oligosaccharide have increased population of CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes to a lesser extent. Enhancing expression of signalling molecules (CD14) and immunoglobulins (CD16) on the neutrophils, the glycopolymers have induced the cells activation. In case of natural killer cells, the lipopolysaccharides have to a greater extent enhanced expression of CD25 (cell-doubling capacity), and the O-specific polysaccharide and core oligosaccharide has induced expression of CD69 (marker of cytotoxic functions).

**Key words:** lymphocytes, lipopolysaccharide of proteobacterium, monocytes, neutrophils.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 59–62.