

УДК 577.112:612.017.1:577.114

## ВЛИЯНИЕ АЛЬГИНАТА НАТРИЯ НА СПОНТАННУЮ И ИНДУЦИРОВАННУЮ ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ *IN VITRO*

Н.В. Сергеева<sup>1</sup>, Л.Н. Богданович<sup>1</sup>, Ю.С. Хотимченко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Медицинское объединение ДВО РАН (690022 г. Владивосток, ул. Кирова, 95),

<sup>2</sup> Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17)

**Ключевые слова:** альгинат натрия, моноклеарные клетки, цитокины.

Изучено влияние альгината натрия на спонтанную и индуцированную продукцию цитокинов (интерлейкинов 2 и 6 и фактора некроза опухоли- $\alpha$ ) моноклеарами периферической крови 16 здоровых доноров. Показано, что альгинат натрия обладает существенной концентрационно-зависимой цитокин-индуцирующей активностью в отношении интерлейкина-2 и слабой – в отношении интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли- $\alpha$ .

Цитокины – продуцируемые клетками белково-пептидные факторы, участвующие в регуляции межклеточных и межсистемных взаимодействий. Наряду с различиями в строении, биологической активности, происхождении и продолжительности существования цитокины обладают сходными характеристиками, объединяющими их в самостоятельную систему регуляции. Дисбаланс цитокинов приводит к дефектам иммунного ответа, нарушениям защитных и формированию патологических ответных реакций организма и является важнейшим фактором патогенеза широкого круга заболеваний человека [4–6]. В связи с этим растет интерес к изучению функциональной активности иммунокомпетентных клеток на основании определения показателей спонтанной и индуцированной продукции ими цитокинов. Результаты оценки спонтанной продукции цитокинов *ex vivo* позволяют оценить активацию клеток крови в организме обследуемого пациента, а индуцированная митогеном продукция – их потенциальную способность к секреции цитокинов.

В последние годы для восстановления функций иммунной системы все чаще стали использовать препараты природного происхождения. Среди веществ, способных восстанавливать функциональную активность иммунокомпетентных клеток, особое место отводится природным полисахаридам, которые могут не только модулировать различные свойства иммунной системы, но и обладают энтеросорбционными свойствами. К таким веществам относятся полисахариды бурых водорослей, в частности альгиновая кислота и ее соли [1, 2, 9–11]. Альгинаты состоят из остатков гулуруновой и мануруновой кислот, соединенных между собой 1→4 связью. В последние годы появились экспериментальные данные о наличии у этих соединений фармакологической активности [1, 7].

Целью работы явилась оценка влияния альгината натрия, выделенного из бурой водоросли *Laminaria japonica*, на спонтанную и индуцированную липополисахаридом (ЛПС) продукцию фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) и интерлейкинов (ИЛ) 2 и 6 иммунокомпетентными клетками крови.

**Материал и методы.** Работа проводилась на базе Медицинского объединения ДВО РАН (г. Владивосток). Альгинат натрия с молекулярной массой 403 кДа получен в лаборатории фармакологии Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Материалом для исследования послужила гепаринизированная кровь 16 здоровых доноров. Способность альгината натрия индуцировать продукцию ФНО- $\alpha$ , ИЛ-2 и ИЛ-6 в опытах *in vitro* была определена на основе методики J. Bienvenu *et al.* [8]: кровь разводили (1:5) стерильной средой 199 с добавлением 2 мМ L-глутамин (Sigma) и 80 мкг/мл гентамицина. Для оценки спонтанной продукции цитокинов по 100 мкл разведенной крови в лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл разведенной крови. Для оценки индуцированной продукции цитокинов кровь вносили в лунки планшетов, содержащих в различных концентрациях (от 1 нг/мл до 10 мкг/мл): 1) по 100 мкл раствора ЛПС *E. coli* (Sigma); 2) по 100 мкл раствора альгината натрия; 3) по 100 мкл раствора альгината натрия и ЛПС (50+50 мкл). Планшеты культивировали в течение 24 часов при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, с использованием инкубатора Galaxy 14S (Германия), после чего отбирали супернатанты и определяли концентрацию цитокинов методом твердофазного иммуноферментного анализа коммерческими тест-системами «Протеиновый контур» – для ИЛ-2 и ИЛ-6 и «Цитокин» – для ФНО- $\alpha$ . Учет результатов проводили при длине волны 450 нм с использованием микропланшетного фотометра  $\mu$ Quant BioTek (США).

Чтобы уточнить действие альгината натрия на intactные клетки, был проведен анализ расчетных коэффициентов продукции цитокинов в присутствии исследуемого вещества относительно их спонтанной продукции. Используя уровни спонтанной и индуцированной продукции, вычисляли ряд индексов. Индекс стимуляции митогенами рассчитывали как отношение показателей индуцированного ЛПС синтеза цитокинов к спонтанной продукции. Индекс влияния альгината натрия на продукцию цитокинов вычисляли как отношение синтеза под влиянием альгината натрия и индуцированной ЛПС секреции цитокина при инкубации

Таблица

Показатели индекса стимуляции (ИС) митогеном – ЛПС и индекса влияния (ИВ) альгината натрия на спонтанную и индуцированную продукцию цитокинов.

Концентрация индуктора	ИС ИЛ-2			ИС ИЛ-6			ИС ФНО-α		
	ЛПС	альгинат	ЛПС+альгинат	ЛПС	альгинат	ЛПС+альгинат	ЛПС	альгинат	ЛПС+альгинат
1 нг/мл	9,85±0,16	6,85±0,18	7,16±0,14	17,73±0,80	2,65±0,09	22,55±1,03	27,71±0,57	2,74±0,24	27,36±0,56
10 нг/мл	10,67±0,15	9,75±0,16	9,98±0,24	18,49±0,83	2,84±0,08	22,33±1,03	30,33±0,75	3,02±0,31	33,06±0,71
100 нг/мл	11,59±0,16	10,62±0,14	11,56±0,17	19,32±0,85	3,34±0,11	23,19±1,06*	31,48±0,65	3,17±0,29	37,42±0,64
1 мкг/мл	12,77±0,14	13,48±0,16	15,13±0,14	23,93±1,09	4,16±0,14	24,50±1,10*	36,43±0,87	3,57±0,31	40,77±0,93
10 мкг/мл	15,43±0,15	14,09±0,16	15,54±0,13	25,23±1,08	4,65±0,14	27,15±1,24*	44,04±0,85	4,01±0,29	46,13±1,10*

\* Увеличение индекса влияния альгината натрия статистически значимо по сравнению с индексом стимуляции ЛПС.

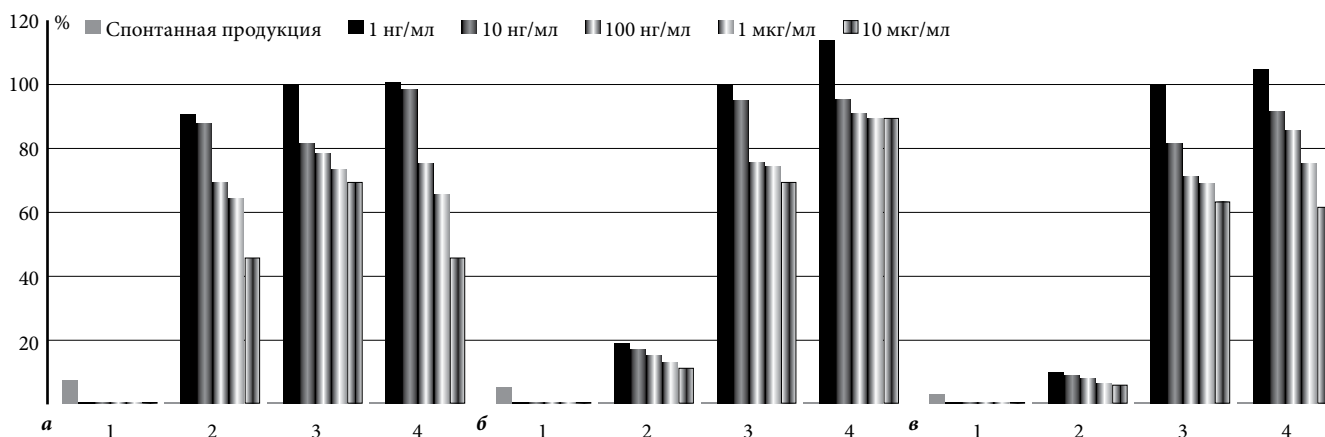


Рис. 1. Продукция цитокинов под влиянием альгината натрия, индуцированная ЛПС и ЛПС с добавлением альгината натрия: а – ИЛ-2, б – ИЛ-6, в – ФНО-α; 1 – контроль, 2 – альгинат натрия, 3 – ЛПС, 4 – ЛПС и альгинат натрия.

с альгинатом натрия к показателю спонтанной продукции цитокина без альгината натрия [3]. Для оценки способности альгината натрия активировать иммунокомпетентные клетки и вызывать синтез ими цитокинов в качестве контроля использовали известный митоген – ЛПС, цитокинпродуцирующая активность которого была принята за 100 %.

Результаты исследований представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ( $M \pm m$ ). Достоверность различий оценивали с использованием программного обеспечения StatSoft Statistica 6.0 по t-критерию Стьюдента.

**Результаты исследования и обсуждение полученных данных.** Альгинат натрия сам по себе обладал существенной способностью активировать синтез ИЛ-2 (спонтанная продукция для ИЛ-2 составила  $31,75 \pm 0,44$  пг/мл, или 7 % от активности ЛПС). В то же время его активность в отношении синтеза ИЛ-6 и ФНО-α была менее значительна: для ИЛ-6 –  $19,47 \pm 1,15$  пг/мл, 4 % от активности ЛПС; для ФНО-α –  $24,31 \pm 0,65$  пг/мл, 2,3 % от активности ЛПС (рис.).

При взаимодействии с мононуклеарами периферической крови альгинат натрия инициировал синтез ИЛ-2 на уровне, соизмеримом с известным индуктором активации цитокинов – ЛПС. Достоверных различий между стимуляцией ЛПС и альгинатом натрия не выявлено. При высокой концентрации (1 мкг/мл) альгинат натрия усиливал синтез ИЛ-2, индуцированного ЛПС,

в то время как в низких дозах (1 нг/мл) незначительно ингибировал действие ЛПС (табл.).

Альгинат натрия оказался слабым индуктором ИЛ-6 по сравнению с ЛПС, однако при всех концентрациях просматривалась тенденция к усилению ЛПС-индуцированного синтеза ИЛ-6 (достоверно при концентрациях 100 нг/мл, 1 и 10 мкг/мл, табл.).

В отношении ФНО-α без индукторов альгинат натрия обладал незначительной цитокинпродуцирующей активностью, однако при всех концентрациях полисахарид усиливал его ЛПС-индуцированную продукцию (достоверно при концентрации 10 мкг/мл), при остальных же концентрациях наблюдалась лишь тенденция к увеличению продукции ФНО-α, кроме того, при концентрации 1 нг/мл происходило незначительное угнетение синтеза этого цитокина (табл.).

Таким образом, экспериментальные данные показали, что альгинат натрия обладает концентрационно-зависимым цитокинпродуцирующим действием, поскольку способен влиять на клетки моноцитарно-макрофагального звена, модулируя продукцию цитокинов. Так как развитие любого иммунного ответа начинается с клеток моноцитарно-макрофагальной системы и цитокины, продуцируемые моноцитами/макрофагами, обладают плеiotропным эффектом, можно предположить, что усиление под влиянием альгината натрия их функциональной активности ведет к активации и клеточного, и гуморального иммунитета.

*Работа поддержана грантом ДВО РАН по проблеме «Фундаментальные и прикладные исследования в интересах медицины».*

#### References

1. Vorobev V.V. Creation of bioactive pharmaceutical substances and drugs from marine aquatic, *Vestnik biotekhnol.* 2009. V. 4, no. 1. P. 33–38.
2. Ermak I.M., Davydova V.N., Aminin D.L. et al. Immunomodulatory activity of carrageenan from the red algae of the Far Eastern seas, *Pacific Medical Journal.* 2009. No. 3. P. 40–44.
3. Zurochka V.A., Dolgushin I.I., Simbircev A.S. Effect of immunomodulator «Bestim» in vitro on spontaneous and induced production of cytokines IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-10 immune cells of blood of healthy individuals, *Citokiny i vospalenie.* 2007. Vol. 6. no.1. P. 31–35.
4. Cytokine and respiratory diseases / eds. B.I. Gelcera, E.V. Proseko-voj. Vladivostok: Dalnauka, 2005. 256 p.
5. Totoljan A.A., Frejdlin I.S. The cells of the immune system, Vol. 1, 2. SPb.: Nauka, 2000.
6. Haitov R.M., Ignateva G.A., Sidorovich I.G. Immunology. M.: Medicina, 2002. 536 p.
7. Hotimchenko M.Ju., Sonina L.N. The effectiveness of calcium alginate in toxic liver damage of rats, *Pacific Medical Journal.* 2006. No. 4. P. 27–31.
8. Bienvenu J., Doche C., Gutowski M. et. al. Production of proinflammatory cytokines a cytokines involved in the TH1/TH2 balance is modulated by pentoxifylline, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995. Vol. 25. P. 80–84.
9. Kilpatric D.C. Immunological aspects of the potential role of dietary carbohydrates and lectins in human health, *Eur. J. Nutr.* 1999. Vol. 38. P. 107–117.
10. Lahaye M., Kaeffer B. Seaweed dietary fibres: structure, physico-chemical and biological properties relevant to intestinal physiology, *Sciences and Aliments.* 1997. Vol. 17. P. 563–584.
11. Rosha de Souza M.C., Marques C.T., Guerra Dore C.M. et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds, *Journal of Applied Physiology.* 2007. Vol. 19. P. 153–160.

Поступила в редакцию 25.03.2011.

#### EFFECT OF SODIUM ALGINATE ON SPONTANEOUS AND INDUCED CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY DONORS IN VITRO

N. V. Sergeeva<sup>1</sup>, L.N. Bogdanovich<sup>1</sup>, Yu.S. Khotimchenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical Association of FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russian Federation), <sup>2</sup>Institute of Marine Biology (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russian Federation)

**Summary** – The paper describes effects of sodium alginate on the spontaneous and induced cytokine production (interleukin 2 and 6 and tumour necrosis factor- $\alpha$ ) by peripheral blood mononuclear cells of 16 healthy donors. As reported, the sodium alginate appears to have considerable concentration-dependent cytokine-induced action on interleukin 2 and weak action on interleukin 6 and tumour necrosis factor- $\alpha$ .

**Key words:** sodium alginate, mononuclear cells, cytokines.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 35–37.

УДК 615.322:577.114:582.272

## ПРЕБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *FUCUS EVANESCENS* И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

*Т.А. Кузнецова*<sup>1</sup>, *Т.С. Запорожец*<sup>1</sup>, *И.Д. Макаренкова*<sup>1</sup>, *Н.Ф. Тимченко*<sup>1</sup>, *Н.Н. Беседнова*<sup>1</sup>, *Т.Н. Звягинцева*<sup>2</sup>, *Н.М. Шевченко*<sup>2</sup>, *Н.В. Мандракова*<sup>3</sup>, *В.Г. Мельников*<sup>4</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), <sup>3</sup>Владивостокский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

<sup>4</sup>Международный научно-технический центр (127473 г. Москва, ул. Краснопролетарская, 32–34, а/я 20)

**Ключевые слова:** пребиотики, продукты функционального питания, фукоидан, альгинат.

Проведено исследование пребиотического потенциала полисахаридов (ПС) из бурой водоросли *Fucus evanesens* в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что сульфатированный полисахарид фукоидан и низкомолекулярная альгиновая кислота способствуют усилению роста и накопления биомассы бифидобактерий, т.е. проявляют пребиотическую активность. На модели экспериментального лекарственного дисбактериоза у мышей, получавших эти ПС в составе кисломолочного напитка с бифидобактериями, выявлено восстановление количественного и качественного состава кишечной микрофлоры. Наличие пребиотической активности открывает перспективы для включения исследуемых ПС в состав продуктов функционального питания, биологически активных добавок к пище и синбиотических препаратов для коррекции нарушений микробиотического у человека.

Большой интерес при разработке лекарственных препаратов и продуктов функционального питания,

Кузнецова Татьяна Алексеевна – д-р мед. наук, зав. лабораторией иммунологии НИИЭМ СО РАМН; тел.: +7 (423) 244-24-46; e-mail: takuznets@mail.ru

предназначенных для коррекции нарушений микробиотического у человека, представляют биологически активные вещества, наделенные свойствами пребиотиков. Вещества могут быть классифицированы как пребиотики, если обладают следующими свойствами: не расщепляются пищеварительными ферментами в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, в неизменном виде достигают толстого кишечника, селективно ферментируются его микрофлорой, стимулируют активный рост бифидобактерий, лактобактерий и других полезных микроорганизмов [14, 15].

В качестве пребиотиков выступают растворимые пищевые волокна – углеводоподобные соединения (полисахариды, олигосахариды), обычно связанные с растительными веществами и составляющие клеточные стенки растений (съедобных злаков, корнеплодов, фруктов, водорослей). Значительный интерес представляют бурые водоросли, которые богаты пищевыми волокнами: 25–75 % от сухого веса, при этом