

УДК 615.37:577.114:582.272

DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2018.4.49-52

Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*

Т.С. Запорожец¹, А.К. Гажа¹, Т.Н. Звягинцева², О.С. Маляренко², Н.Н. Беседнова¹

¹ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ² Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (690022, г. Владивосток, пр-т 100-летия Владивостока, 159/2)

Фукоиданы – водорастворимые, высокосульфатированные, разветвленные гомо- и гетерополисахариды, полученные из морских бурых водорослей – обладают свойствами миметиков природных лигандов белков-рецепторов, действуют как промоторы и ингибиторы биологических реакций, в том числе связанных с реализацией иммунного ответа и развитием воспаления. В настоящей работе представлены результаты изучения действия фукоидана из *Fucus evanescens* на процессы пролиферации и апоптоза лимфоцитов периферической крови человека. Фукоидан оказывал влияние на способность лимфоцитов к бласттрансформации в зависимости от степени пролиферативного потенциала клеток: при исходно низком уровне спонтанной пролиферации проявлял стимулирующее действие, при высоком – ингибировал пролиферацию. Направленность эффекта фукоидана различалась также в зависимости от исходного состояния клеток (покой или активация) и конечной концентрации полисахарида в среде культивирования. Заключается, что исходом активации лимфоцитов при действии на них митогена (фитогемагглютинин) и фукоидана может быть как пролиферация, так и апоптоз. Увеличение количества апоптотических клеток при внесении фукоидана в культуру лимфоцитов, активированных фитогемагглютинином, на высоте пролиферации может быть отражением суммации митогенных сигналов фукоидана и митогена.

Ключевые слова: сульфатированные полисахариды, активация лимфоцитов, пролиферация, апоптоз

Углеводы, участвующие в важнейших биологических процессах, считаются относительно неиспользованным источником лекарств, открывающим новые возможности терапевтического воздействия при процессах, в развитии которых они играют ключевую роль. К ним относятся воспаление, рак и инфекции. Потенциальная значимость углеводов-углеводных и углевод-белковых взаимодействий детерминирована присутствием на внешней поверхности клеток множества гликолигандных структур, образующих гликокаликс, а также различных типов мембраносвязанных углеводсвязывающих белков, которые расшифровывают гликокод и распознают определенные сахара [11]. Эти же компоненты присутствуют в растворимой форме в окружающей клетки среде и способны к аффинному связыванию с комплементарными мембранными гликорепцепторами. Общим признаком таких структур считается способность влиять на процессы внутриклеточной сигнализации.

В последнее время активно развиваются исследования, связанные с возможностью использования в качестве терапевтических средств сложных гликанов (полисахаридов), в том числе гетерополисахаридов. К их числу относятся фукоиданы – водорастворимые, высокосульфатированные, разветвленные гомо- и гетерополисахариды из морских бурых водорослей, где основным моносахаридным остатком служит L-фукоза [15]. Широкий спектр биологических свойств фукоиданов определяется их структурным сходством с гепарансульфат гликозаминогликанами, обнаруженными в базальных мембранах, во внеклеточном матриксе, а также на поверхности клеток в составе мембран [10]. Связывание гепарин/гепарансульфатов с другими

макромолекулами обеспечивает структурную организацию внеклеточного матрикса в соединительных тканях, контроль гомеостаза, регуляцию клеточного метаболизма, дифференцировки и агрегации клеток и др. и дает возможность модулировать влияние многих сигнальных молекул на клетку [13]. Фукоиданы, будучи природными миметиками гепарансульфат гликозаминогликанов, проявляют бифункциональные эффекты, выступая в качестве, как промоторов, так и ингибиторов биологических реакций, в том числе при реализации иммунного ответа и развитии воспаления [5, 10]. В механизмах иммуномодуляции ведущую роль играют процессы активации, пролиферации и дифференцировки лимфоцитов, межклеточные взаимодействия и сопутствующая продукция цитокинов. Вместе с тем, апоптоз – запрограммированная клеточная гибель – обеспечивает естественный механизм элиминации клеток, ограничивающий экспансию активированных клонов, развитие воспаления и аутоиммунных реакций [3]. Авторы публикаций о молекулярных связях между путями выживания и сигнальными апоптозными путями предполагают участие рецепторов смерти и их регуляторов в механизмах роста и дифференцировки, и рассматривают апоптоз и пролиферацию как альтернативные формы ответа клеток на стимуляцию [1, 4]. В этой связи изучение параметров основных гомеостатических систем – пролиферации и апоптоза – несет важную биологическую информацию и целесообразно для более полной характеристики веществ, перспективных для создания иммуномодулирующих лекарственных препаратов.

Ранее мы показали, что фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens* наряду с противоопухолевыми, противовирусными, антикоагулянтными, свойствами обладает противовоспалительным,

иммуномодулирующим и апоптозрегулирующим действием [2, 7]. Цель настоящей работы заключалась в определении влияния фукоидана из *F. evanescens* на динамические процессы пролиферации и апоптоза лимфоцитов периферической крови человека.

Материал и методы

Фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* был выделен в соответствии с протоколом (патент WO 2005/014657 A1) и структурно охарактеризован, как описано ранее [14]. Анализ моносахаридного состава показал, что полисахарид содержал следующие моносахариды (%): Fuc – 79, Xyl – 7, Man – 2, Gal – 12; соотношение сульфатов: Fuc:SO₃, моль/моль – 1:(0,7–1).

Лимфоциты периферической крови здоровых доноров выделяли на градиенте плотности фиколл-верографина ($d = 1,077$), отмывали фосфатно-солевым буфером, доводили до концентрации 2×10^6 /мл полной ростовой средой, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 0,01M NEPES, 200мM L-глутамин, 10^{-5} M 2-меркаптоэтанола, 100 мг/мл гентамицина. Выход жизнеспособных клеток, оцениваемый по окраске трипановым синим, составлял более 90%. Клеточную взвесь 2×10^6 /мл в объеме 200 мкл засеивали в лунки 96-луночных планшетов и культивировали при 37°C в течение 96 часов в газовой среде с 5% CO₂. В качестве митогена использовали фитогемагглютинин (Sigma, США) в дозе 1 или 10 мкг/мл. По истечении 72 часов (на пике пролиферации) в лунки вносили фукоидан в изучаемых дозах и инкубировали 24 часа. По окончании инкубации исследовали количество апоптотических клеток цитофлуориметрическим методом измерения гиподиплоидной ДНК, окрашенной пропидиум йодидом (Sigma, США). Пролиферативную активность лимфоцитов оценивали по включению ³H-тимидина с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Mark-III.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы Statistica 6. Использовали описательную статистику с вычислением средних (M), их стандартных ошибок (m) и значимости различий между средними на основе t -критерия Стьюдента (p). При анализе взаимосвязи между переменными использовали коэффициент корреляции (r) Спирмена и коэффициент детерминации (R^2).

Результаты исследования

Фитогемагглютинин (ФГА) – Т-клеточный митоген, моделирует состояние активации лимфоцитов *in vitro* и обеспечивает возможность выяснения закономерностей действия исследуемых веществ на популяцию Т-клеток с максимальной приближенностью к условиям живого организма. В предварительных исследованиях мы установили модулирующее влияние фукоидана из *F. evanescens* на способ-

ность лимфоцитов периферической крови человека к бласттрансформации в зависимости от степени пролиферативного потенциала клеток: при исходно низком уровне спонтанной пролиферации полисахарид проявлял стимулирующее действие, при высоком – ингибировал пролиферацию. В дальнейшем, для выявления зависимости пролиферации лимфоцитов от дозы фукоидана использовали культуры клеток с низкой пролиферативной активностью. Фукоидан проявлял митогенные свойства, увеличивая спонтанную пролиферацию лимфоцитов в конечной концентрации от 1 до 100 мкг/мл. Направленность данного эффекта также различалась в зависимости от исходного состояния клеток (покой или активация), при этом комитогенное действие проявлялось в случае субоптимальной активации лимфоцитов ФГА (1 мкг/мл). В низких дозах (1 мкг/мл) фукоидан стимулировал, а в конечной концентрации 100 мкг/мл – подавлял митогенстимулированную пролиферацию лимфоидных клеток (табл.).

Уровень спонтанной фрагментации ДНК в культуре лимфоцитов составлял $11,5 \pm 1,4\%$. Через 96 часов после действия ФГА в конечной концентрации 10 мкг/мл регистрировалось значимое усиление апоптоза лимфоцитов, превышавшее его среднее исходное значение ($20,4 \pm 2,1\%$, $p = 0,007$) при концентрации клеток в культуре 5×10^6 /мл. Внесение фукоидана в культуру лимфоцитов на пике пролиферации в процессе ответа на ФГА (через 72 часа культивирования) в конечной концентрации 1 мкг/мл и 10 мкг/мл не изменяло ($24 \pm 2,9$ и $21,5 \pm 2\%$, соответственно), а в концентрации 100 мкг/мл значимо увеличивало количество апоптотических клеток до $47,5 \pm 6,8\%$.

При построении аппроксимирующих кривых зависимости уровней пролиферации и апоптоза от конечной концентрации фукоидана продемонстрировано, что в присутствии митогена (ФГА) использование минимальной и средней доз фукоидана сопровождалось усилением пролиферации и апоптоза (пролиферация оценивалась через 72 часа, апоптоз – через 96 часов культивирования) ($r = 0,68 \pm 0,18$, $p < 0,05$ при использовании дозы 10 мкг/мл; $r = 0,83 \pm 0,13$, $p < 0,01$ при использовании дозы 1 мкг/мл). В максимальной дозе

Таблица

Влияние фукоидана на спонтанную и митогениндуцированную пролиферацию лимфоцитов периферической крови

Вариант опыта	Доза, мкг/мл	Включение ³ H-тимидина					
		МИП ^а , имп./мин.			СП ^б , имп./мин.		
		$M \pm m$	$p^в$	ИС ^г	$M \pm m$	$p^д$	ИС ^г
Контроль	–	–	–	–	1634±173	–	–
ФГА	1	11193±950	–	–	–	0,000	–
	1	16229±1003	0,006	1,5	2124±224	0,130	1,3
	10	12213±876	0,192	1,1	2778±276	0,060	1,7
	100	7552±591	0,008	0,8	3300±292	0,003	2,0

^а Митоген-индуцированная пролиферация.

^б Спонтанная пролиферация.

^в Значимость различий по сравнению с опытом «ФГА».

^г Индекс стимуляции – отношение среднего значения пролиферации (имп./мин.) в опытных и контрольных культурах.

^д Значимость различий по сравнению с контролем (интактные клетки).

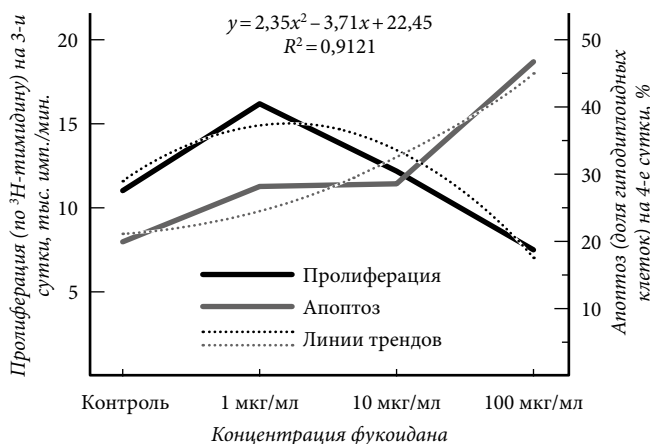


Рис. Эмпирические данные и аппроксимирующие кривые зависимости уровня пролиферации и апоптоза от конечной концентрации фукоидана в среде культивирования.

(100 мкг/мл) между выраженностью апоптотической реакции и пролиферативными процессами выявлена тесная отрицательная корреляционная связь ($r = -0,90 \pm 0,19$, $p < 0,01$): способность лимфоцитов к пролиферации снижалась, а количество апоптотических клеток увеличивалось. Выявленную закономерность наглядно иллюстрируют линии полиномиального тренда (рис.).

Обсуждение полученных данных

Основной принцип функционирования физиологических систем – поддержание биологической целостности организма. На клеточном уровне данный процесс реализуется за счет регуляторного влияния эфферентных сигналов, обеспечивающих сложное состояние равновесия между интегративными физиологическими процессами – пролиферацией, дифференцированием и программируемой клеточной гибелью. Иммунный ответ, сопряженный с активацией лимфоцитов, может приводить, в зависимости от ряда внешних и внутренних факторов, к двум взаимоисключающим исходам – пролиферации и апоптозу. Общность сигнальных путей, рецепторов роста и смерти детерминирована необходимостью обеспечения гибели клеток, подверженных всплескам быстрой и интенсивной пролиферации. Механизмы, контролирующие чувствительность Т-клеток к активационному апоптозу, до конца не ясны. Тем не менее, очевидно, что модуляция апоптоза Т-лимфоцитов осуществляется на нескольких уровнях, включая регуляцию апоптозиндуцирующих сигналов и их рецепторов, костимулирующих сигналов (цитокинов, гормонов, контактной стимуляции), вторичных сигнальных мессенджеров апоптоза (фосфатаз, киназ, транскрипционных факторов) и метаболических каскадов, вызывающих непосредственное повреждение клетки (активных форм кислорода, протеаз, нуклеаз и др.) [3, 4]. Как и при активации лимфоцитов, при апоптозе передача сигнала регулируется трансмембранной тирозин-фосфатазой CD45 [4, 6]. Ионы Ca^{2+} , играющие важнейшую роль в клеточной пролиферации, инициируют формирование пор в митохондриальных мембранах

и истечение апоптотических факторов из митохондрий. В реализации апоптоза участвует и ряд транскрипционных факторов, ответственных за выход клетки из фазы покоя в цикл или за продвижение по циклу (факторы Nur-77 и с-мус, NF-κB) [3]. При этом, с одной стороны, стимуляция лимфоцитов активирует транскрипционный фактор NF-κB, который опосредует экспрессию генов *TRAF-1*, *TRAF-2*, *cIAP-1* и *cIAP-2*, блокирующих активацию каспазы-8, ключевого инициатора апоптоза, и ингибирует апоптоз, с другой – классические рецепторы апоптоза (рецепторы к Fas, фактору некроза опухоли-α, TRAIL) могут проводить как проапоптотический, так и антиапоптотический сигналы [4, 12]. Выбор пути, по которому движется клетка, определяется дозой, нагрузкой лиганда, взаимодействующего с рецептором, вовлечением других рецепторов.

Известно также, что зрелые Т-лимфоциты, циркулирующие в крови, относительно резистентны к проапоптотическим сигналам за счет стабильной экспрессии Bcl-2, однако чувствительность клеток к апоптозу увеличивается при активации митогенами и коррелирует с пролиферативной активностью [8]. Пролиферация при этом развивается быстрее и раньше достигает максимума (соответственно на 3-и и 5–6-е сутки), а продолжительность апоптотической реакции длительнее пролиферативной. Кульминацией иммунного ответа считается гибель большинства активированных Т-лимфоцитов, при действии дополнительных факторов эффективность индукции активационного апоптоза резко усиливается на пике пролиферативного ответа [1, 3].

Результаты настоящего исследования свидетельствуют, что исходом активации Т-лимфоцитов при действии на них Т-клеточного митогена и фукоидана из *F. evanescens* может быть как пролиферация, так и апоптоз. Увеличение количества апоптотических клеток при внесении фукоидана в культуру лимфоцитов, активированных ФГА, в конечной концентрации 100 мкг/мл, демонстрирует усиление чувствительности клеток к индукции апоптоза на высоте пролиферации.

Ранее мы показали, что фукоидан из *F. evanescens* обладает проапоптогенной активностью в отношении лимфоцитов периферической крови в дозе 500 мкг/мл и не вызывает гибели этих клеток в 24-часовых культурах при конечной концентрации 100 мкг/мл. Реализация апоптоза лимфоидных элементов, индуцированная фукоиданом, была связана со снижением трансмембранного митохондриального потенциала и антиапоптотического протеина Bcl-xL [7]. Увеличение количества апоптотических клеток при внесении фукоидана в конечной концентрации 100 мкг/мл в культуру лимфоцитов, активированных ФГА, вероятно, обусловлено усилением чувствительности активированных клеток к индукции апоптоза на высоте пролиферации и может быть отражением суммации митогенных и проапоптотических сигналов фукоидана и ФГА. Вместе с тем, было подтверждено действие фукоидана из *F. evanescens* и как лиганда для Toll-подобных рецепторов, вызывающего активацию NF-κB при взаимодействии с этими

рецепторами. Показано также, что фукоидан из *F. evanescens* индуцирует продукцию активных форм кислорода нейтрофилами, синтез фактора некроза опухоли- α и интерлейкина-1 мононуклеарами, усиливает экспрессию рецепторов адгезии [2]. Апоптоз, индуцированный фактором некроза опухоли- α и Fas, в определенной степени обусловлен их способностью вызывать в клетке образование реактивных форм кислорода [13]. Кроме того, показано, что связывание рецептора адгезии L-селектина с углеводным лигандом фукоиданом индуцирует апоптоз в рецептор-экспрессирующих клетках [9]. Эти данные демонстрируют, что адгезивный сигнал, индуцированный фукоиданом, может быть преобразован в сигнал, ведущий к апоптотической смерти клетки. Учитывая полученные нами ранее данные, можно полагать, что оксидативный стресс, индукция цитокинов и адгезивный сигнал также вносят вклад в обеспечение проапоптотических свойств фукоидана.

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты позволяют заключить, что исходом активации Т-лимфоцитов при действии на них митогена (ФГА) и фукоидана может служить как пролиферация, так и апоптоз. Ключевые события, определяющие выбор между этими формами, связаны с внутриклеточными механизмами (активацией NF- κ B, экспрессией Bcl-xL, снижением трансмембранного митохондриального потенциала) и зависят от интенсивности стимулирующего сигнала (дозы фукоидана), исходного состояния клетки (активация, покой) и ее внутренних потенциалов (пролиферативного потенциала).

Литература / References

1. Никонова М.Ф., Литвина М.М., Варфоломеева М.И. [и др.]. Апоптоз и пролиферация как альтернативные формы ответа Т-лимфоцитов на стимуляцию // Иммунология. 1999. Т. 20, № 2. С. 20–23.
Nikonova M.F., Litvina M.M., Varfolomeeva M.I. [et al.]. Apoptosis and proliferation as alternative forms of T-lymphocyte response to stimulation // Immunology. 1999. Vol. 20, No. 2. P. 20–23.
2. Фукоиданы – сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства / Анастюк С.Д., Беседнова Н.Н., Богданович Л.Н. [и др.]. Владивосток: Дальнаука, 2014. 377 с.
Fukoidany – sulfatirovannye polisaharidy buryh vodorosley. Struktura, fermentativnaya transformatsiya i biologicheskiye svoystva / Anastasyuk S.D., Besednova N.N., Bogdanovitch L.N. [et al.]. Vladivostok: Dalnauka, 2014. 377 p.
3. Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии: избранные лекции / под ред. Б.Б. Мороза. М.: Медицина, 2001. С. 13–56.
Yarilin A.A. Apoptoz: priroda fenomena i ego rol' v norme i pri patologii // Aktualnye problem patofiziologii / Ed. by B.B. Moroz. Moscow: Meditsina, 2001. P. 13–56.
4. Budd R. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis // J. Clin. Invest. 2002. Vol. 109, No. 4. P. 437–442.
5. Chen D., Wu X., Wen Z. Sulfated polysaccharides and immune response: promoter or inhibitor? // Panminerva Med. 2008. Vol. 50, No. 2. P. 177–183.
6. Dupéré-Minier G., Desharnais P., Bernier J. Involvement of tyrosine phosphatase CD45 in apoptosis // Apoptosis. 2010. Vol. 15, No. 1. P. 1–13.
7. Gazha A.K., Zaporozhets T.S., Kuznetsova T.A. [et al.]. Effect of sulfated polysaccharides from brown algae on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes // Bull. Exp. Biol. Med. 2015. Vol. 159, No. 5. P. 617–619.
8. Hildeman D.A., Zhu Y.N., Mitchell T.C. [et al.]. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo // Curr. Opin. Immunol. 2002. Vol. 14. P. 354–359.
9. Ishiwatari-Hayasaka H., Kawashima H., Osawa T. [et al.]. Induction of cell death by chimeric L-selectin-Fas receptors // Int. Immunol. 1997. Vol. 9, No. 4. P. 627–635.
10. Krylov V.B., Ustyuzhanina N.E., Nifant'ev N. Synthesis of low molecular weight carbohydrate mimics heparin // Bioorg. Chem. 2011. Vol. 37. P. 745–779.
11. Nangia-Makker P., Conklin J., Hogan V. [et al.]. Carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents // Mol. Medicine. 2002. Vol. 8. P. 187–192.
12. Sakata K., Sakata A., Vela-Roch N. [et al.]. Fas (CD95)-transduced signal preferentially stimulates lupus peripheral T lymphocytes // Eur. J. Immunol. 1998. Vol. 28. P. 2648–2660.
13. Sheng G.J., Oh Y.L., Chang S.K. [et al.]. Tunable heparan sulfate mimetics for modulating chemokine activity // J. Am. Chem. Soc. 2013. Vol. 135. P. 10898–10901.
14. Vishchuk O.S., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N. The fucoidans from brown algae of Far-Eastern seas: Anti-tumor activity and structure-function relationship // Food. Chem. 2013. Vol. 141. P. 1211–1217.
15. Wijesinghe W., Jeon Y. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review // Carbohydrate Polymers. 2012. Vol. 88, No. 1. P. 13–20.

Поступила в редакцию 11.09.2018.

CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS OF IMMUNOMODULATORY ACTION OF FUCOIDAN FROM BROWN ALGA *FUCUS EVANESCENS*

T.S. Zaporozhets¹, A.K. Gazha¹, T.N. Zvyagintseva², O.S. Malyarenko², N.N. Besednova¹

¹ Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russian Federation), ² G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry (159/2 100 Anniversary of Vladivostok Ave. Vladivostok 690022 Russian Federation)

Objective. To determine the effect of fucoidan from *Fucus evanescens* on the dynamic processes of proliferation and apoptosis of human peripheral blood lymphocytes.

Methods. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were prepared by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation and cultured in 96-well flat-bottom culture plates in complete were medium RPMI 1640. PBMCs were either unstimulated or stimulated in vitro with the mitogen phytohemagglutinin (final concentration 1 and 10 μ g/ml), fucoidan (final concentration 1, 10, 100 μ g/ml). At the end of the incubation, the number of apoptotic cells was examined by a cytofluorimetric method of measuring hypodiploid DNA stained with propidium iodide. Cell proliferation was measured PBMCs by [³H] thymidine incorporation into DNA.

Results. Fucoidan from *F. evanescens* influenced the ability of PBMCs to blast transformation depending on the degree of proliferative cell potential: at the initially low level of spontaneous proliferation, the polysaccharide showed a stimulating effect, at the high level of spontaneous proliferation had an inhibitory effect. The direction of the effect of fucoidan also differed depending on the initial state of the cells (rest or activation) and the dose of the polysaccharide.

Conclusions. The outcome of the activation of T-lymphocytes by mitogen and fucoidan can be both proliferation and apoptosis. The increase in the number of apoptotic cells upon introduction of fucoidan into the culture of lymphocytes activated by phytohemagglutinin is due to the increased sensitivity of activated cells to the induction of apoptosis at the height of proliferation and may be a reflection of the summation of mitogenic signals of fucoidan and phytohemagglutinin.

Keywords: sulfated polysaccharides, lymphocyte activation, proliferation, apoptosis