

УДК 615.37:[615.275.4:577.29: 615.322:582.272.46]:616.032:54.061

© Коллектив авторов

СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ - ЛИГАНДЫ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

И.Д. Макаренкова^{1}, Д.Ю. Логунов², А.И. Тухватулин², И.Б. Семенова³,
Т.Н. Звягинцева⁴, В.И. Горбач⁴, С.П. Ермакова⁴, Н.Н. Беседнова¹*

¹НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, 690087 Владивосток,
ул. Сельская, 1; эл. почта: ilona_m@mail.ru

²НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва

³НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва

⁴Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток

Исследовали взаимодействие сульфатированных полисахаридов - фукоиданов из бурых водорослей *Laminaria japonica*, *Laminaria cichorioides* и *Fucus evanescens* с Toll-подобными рецепторами (TLRs), экспрессированными на мембранах перевиваемых эукариотических клеточных линиях эмбрионального почечного эпителия человека (HEK293-null, HEK293-TLR2/CD14, HEK293-hTLR4/CD14-MD2 и HEK293-hTLR2/6). Установлено, что фукоиданы в системе *in vitro* специфически взаимодействуют с TLR-2, TLR-4 и гетеродимером TLR-2/6, вызывая активацию транскрипционного ядерного фактора NF-κB. Анализ состава гидролизата фукоидана из *F. evanescens* методами газожидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии, свидетельствует об отсутствии в препарате 3-гидрокситетрадекановой кислоты (3-ОНС₁₄) – основного компонента липополисахаридов. Таким образом, полученные результаты позволяют считать, что фукоиданы из бурых водорослей, обладающие выраженной иммуностимулирующей активностью, не содержат примеси липополисахарида, являются самостоятельными лигандами для TLRs, и способны индуцировать генетически детерминированные биохимические процессы для формирования защиты против патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: Toll-подобные рецепторы, транскрипционный ядерный фактор NF-κB, фукоидан, липополисахарид, газожидкостная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время изучение механизмов врождённого иммунитета является одной из актуальных задач клинической иммунологии. Доказано, что активация клеток эффекторов врождённого иммунитета происходит после распознавания экзогенных и эндогенных лигандов прежде всего Toll-подобными рецепторами (Toll-like receptors - TLRs), экспрессированными на поверхности клеток организма [1-7]. Взаимодействие TLRs с лигандами и инициация ими системы сигнальной передачи с последовательной активацией адаптерных белковых молекул, протеинкиназ и транскрипционных ядерных факторов, индуцирующих экспрессию генов провоспалительных цитокинов и интерферониндуцибельных генов, являются важным компонентом врожденного иммунного ответа и решающим фактором для формирования адаптивного иммунного ответа на инфекционные агенты [2, 4, 6, 8].

* - адресат для переписки

В последние годы проводится интенсивная работа по исследованию и созданию нового класса иммунобиологических препаратов – агонистов/антагонистов функций TLRs и их сигнальных путей, которые могут являться эффективным средством иммунопрофилактики и иммунотерапии при инфекционных, аллергических, аутоиммунных, сердечно-сосудистых и онкологических заболеваниях [3, 4, 7, 9].

Большой интерес в этом плане вызывают сульфатированные полисахариды бурых водорослей – фукоиданы, представляющие собой семейство водорастворимых, высоко- и низкосульфатированных, разветвленных гомо- и гетерополисахаридов, где основным моносахаридным остатком является L-фукоза. Фукоиданы различаются по типу связи между остатками α -фукозы в полисахаридной цепи, моносахаридному составу, содержанию сульфатных групп, молекулярной массе [10] и обладают выраженной иммунотропной, антикоагулянтной, противовирусной, противовоспалительной и противоопухолевой активностями [11, 12].

Цель работы – исследование взаимодействия фукоиданов из бурых водорослей в качестве лигандов с TLR-2, TLR-4 и гетеродимером TLR-2/6 человека на эукариотических клеточных линиях HEK293 *in vitro* и определение отсутствия в их составе липополисахарида.

МЕТОДИКА. Выделение, изучение химического состава и структуры фукоиданов из бурых водорослей проведено в ТИБОХ ДВО РАН [10].

Фукоидан из *L. japonica* является α -L-фуканом, сульфатированным в основном по C-4 положению остатков фукозы (диапазон молекулярных масс (м.м.) 10-30 кДа) и отличается высоким содержанием галактозы. Моносахаридный состав представлен фукозой, галактозой, маннозой, ксилозой и глюкозой в соотношении 65:20:8:4:3.

Фукоидан из *L. cichorioides* представляет собой полностью сульфатированный 1 \rightarrow 3- α -L-фукан (интервал м.м. 40-80 кДа).

Фукоидан из *F. evanescens* представляет собой 1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 4- α -L-фукан сульфатированный, в основном, по C-2 положению остатков фукозы (диапазон м.м. 40-60 кДа). Моносахаридный состав представлен фукозой, галактозой, ксилозой и маннозой в соотношении 70:9:10:8. Соотношение фукозы и сульфатов составляет 1:0,9.

Исследование специфического взаимодействия фукоиданов с TLRs человека. В работе использовали клеточные линии эмбрионального почечного эпителия человека (HEK293-TLR2/CD14 и HEK293-TLR2/6), геномы которых содержат репортерный ген фермента β -галактозидазы под контролем NF- κ B (nuclear factor kappa B) зависимого промотора, и соответствующие TLRs человека. Для подтверждения специфичности взаимодействия фукоиданов с TLRs в качестве контроля использовали клетки HEK293-null, не экспрессирующие TLR, но содержащие ген β -галактозидазы под контролем NF- κ B. Для определения функциональной активности репортерной системы, подтверждающей действие рецепторов, в качестве положительных контролей использовали лиганды соответствующих TLRs: синтетический липопептид (10 нг/мл) для TLR-2 и гетеродимера TLR-2/TLR-6, липополисахарид *Escherichia coli* (10 нг/мл) для TLR-4, и TNF- α (10 нг/мл) для клеток HEK293-null.

Для проведения эксперимента клетки HEK293 высевали в 96-луночный планшет по 100 мкл (2×10^4 клеток на лунку) и инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 24 ч. Исследуемые концентрации фукоиданов (от 0,1 до 1000 мкг/мл) вносили в лунки в объеме 10 мкл. Для получения статистически достоверных результатов каждый эксперимент повторяли 3 раза. Уровень экспрессии β -галактозидазы измеряли колориметрически через 72 ч после добавления фукоиданов, определяя скорость расщепления добавляемого неокрашенного субстрата *орто*-нитрофенил- β -галактопиранозида по образованию окрашенного продукта – *орто*-нитрофенола (время инкубации 20 мин, при 37°C). Данный метод позволяет определить взаимодействие лиганда с соответствующим

TLR по характерной окраске, возникающей при расщеплении субстрата под действием экспрессирующегося фермента β -галактозидазы. Измерение оптической плотности (ОП) проводили на спектрофотометре iEMS Reader MF ("Thermolabsystems", США) при длине волны 405 нм (ОП 405 нм).

Определение присутствия эндотоксинов в фукоидане методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) и ГЖХ-масс-спектрометрией (ГЖХ-МС). 0,5 г фукоидана из *F. evanescens* гидролизovali 6 М NaOH (10 мл) в течение 6 ч при 120°C. Реакционную смесь подкисляли 6 М HCl (12 мл), экстрагировали два раза хлороформом (2×20 мл), экстракт сушили Na₂SO₄ и упаривали досуха. Полученные 2,8 мг сиропообразного продукта (0,56% от веса фукоидана) метилировали избытком диазометана в эфире в течение 2 часов и упаривали. Состав полученного образца изучали на хроматографе Agilent 6850 SERIES GL SYSTEMS (Германия), колонка HP-5MS, в программе 175→250°/мин, скорость нагревания 3°/мин. В качестве стандарта использовали 3-гидрокситетрадекановую кислоту (3-ОНC₁₄ "Sigma", США), метилированную по аналогичной методике.

ГЖХ-масс-спектрометрию проводили на хроматографе Hewlett Packard 5890 (США), снабженном капиллярной колонкой со стационарной фазой 5% Phenyl Methyl Siloxane, и соединенном с масс-спектрометром Hewlett Packard 5973, в градиенте температур 120-250°C со скоростью 3°/мин.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием прикладного пакета "Statistica 7".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При исследовании взаимодействия фукоиданов из бурых водорослей с TLRs человека установлено, что препараты в исследуемых концентрациях не оказывают влияния на клетки HEK293-null, не экспрессирующие TLRs (величина оптической плотности $0,696 \pm 0,045$), тогда как TNF- α , взаимодействующий с собственным рецептором (TNFR) на поверхности клеток, активирует транскрипционный фактор NF- κ B, инициируя экспрессию гена β -галактозидазы (величина оптической плотности $2,195 \pm 0,055$; $p=0,002$).

Изучение специфического взаимодействия фукоиданов с TLR-2, TLR-4 и гетеродимером TLR2/TLR6 человека показало, что все исследуемые препараты с разной степенью эффективности вызывают активацию NF- κ B.

При взаимодействии фукоиданов с TLR-2 (рис. 1) установлено, что препараты в исследуемых концентрациях (от 0,1 до 1000 мкг/мл) различаются по способности специфически связываться с рецептором. Так, фукоидан из *L. japonica* при взаимодействии с TLR-2 вызывает активацию NF- κ B в концентрации 1000 мкг/мл ($1,531 \pm 0,147$; $p=0,018$), фукоидан из *L. cichorioides* - 1000 и 100 мкг/мл ($1,852 \pm 0,161$ и $0,744 \pm 0,011$; $p=0,013$ и $0,006$ соответственно), а фукоидан из *F. evanescens* в концентрациях от 1000 до 10 мкг/мл ($2,432 \pm 0,006$; $1,661 \pm 0,038$ и $0,804 \pm 0,059$; $p=0,000$ и $0,027$ соответственно) по сравнению с контролем ($0,423 \pm 0,023$). Действие липопептида, подтверждающего функциональность TLR-2 составило $2,669 \pm 0,076$ ($p=0,000$).

Результаты специфического взаимодействия препаратов с гетеродимером TLR-2/TLR-6 (рис. 2) показали, что фукоиданы из *L. japonica* и *L. cichorioides* вызывают активацию NF- κ B в концентрации 10 мкг/мл ($1,723 \pm 0,035$ и $1,951 \pm 0,057$; $p=0,036$ и $0,022$ соответственно), а фукоидан из *F. evanescens* - от 1,0 до 10 мкг/мл ($1,746 \pm 0,049$ и $2,282 \pm 0,06$; $p=0,036$ и $0,011$ соответственно) по сравнению с контролем ($1,15 \pm 0,107$). Действие липопептида, подтверждающего функциональность рецептора составило $2,679 \pm 0,156$ ($p=0,014$).

При взаимодействии препаратов с TLR-4 (рис. 3) установлено, что фукоидан из *L. japonica* активирует NF- κ B в концентрациях 1000 и 100 мкг/мл ($1,285 \pm 0,008$ и $1,080 \pm 0,072$; $p=0,002$ и $0,029$), фукоидан из *L. cichorioides* - от 1000 до 10 мкг/мл ($1,708 \pm 0,028$; $1,621 \pm 0,037$ и $0,912 \pm 0,007$; $p=0,001$, $p=0,002$ и $0,008$ соответственно), а фукоидан из *F. evanescens* - от 1000 до 1,0 мкг/мл ($1,784 \pm 0,041$; $1,905 \pm 0,071$; $1,407 \pm 0,029$ и $0,890 \pm 0,013$; $p=0,002$, $p=0,003$, $p=0,0020$ и $0,012$ соответственно) по сравнению с контролем ($0,641 \pm 0,024$). Активация NF- κ B, при взаимодействии классического лиганда – ЛПС *E. coli* с TLR-4 составила $2,005 \pm 0,197$ ($p=0,021$).

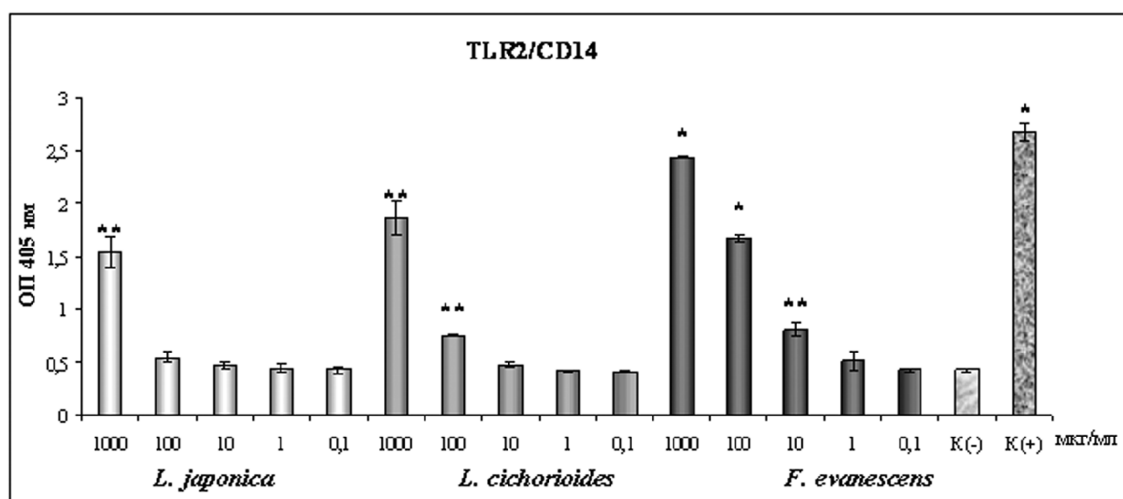


Рисунок 1.

Влияние фукоиданов на активацию транскрипционного ядерного фактора NF-κB при взаимодействии с TLR-2.

* - $p \leq 0,001$, ** - $p \leq 0,05$; ОП 405 нм - оптическая плотность (длина волны 405 нм).
К (-) контроль - клетки линии HEK293□TLR2/CD14, содержащие репортерный ген фермента β-галактозидазы под контролем NF-κB.
К (+) положительный контроль - синтетический липопептид (лиганд для TLR-2).

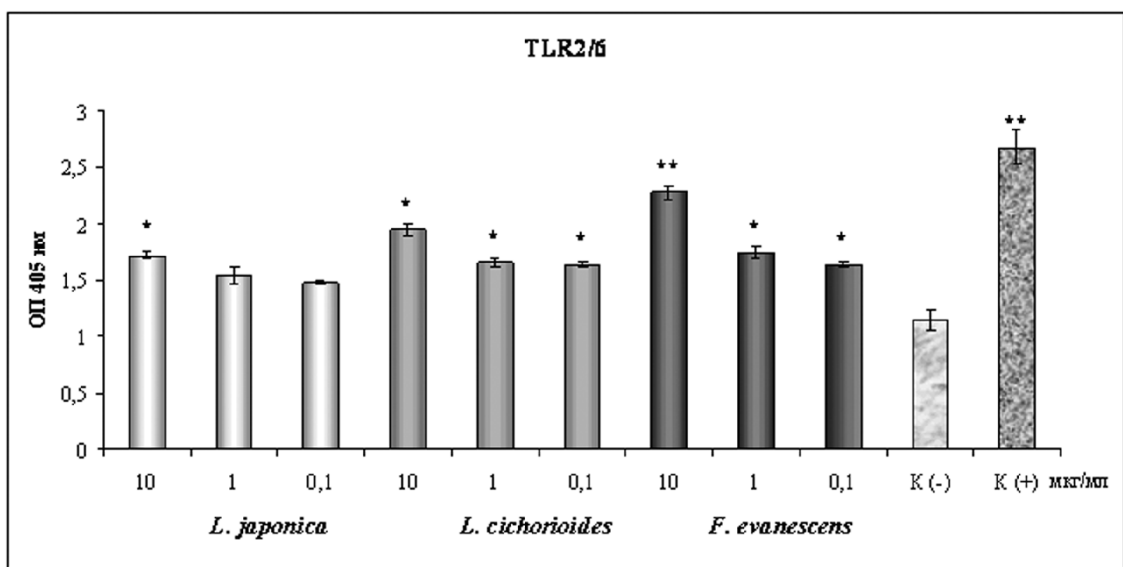


Рисунок 2.

Влияние фукоиданов на активацию транскрипционного ядерного фактора NF-κB при взаимодействии с гетеродимером TLR-2/TLR-6.

* - $p \leq 0,001$, ** - $p \leq 0,05$; ОП 405 нм - оптическая плотность (длина волны 405 нм).
К (-) контроль - клетки линии HEK293□TLR2/TLR6, содержащие репортерный ген фермента β-галактозидазы под контролем NF-κB.
К (+) положительный контроль - синтетический липопептид (лиганд для TLR-2/TLR-6).

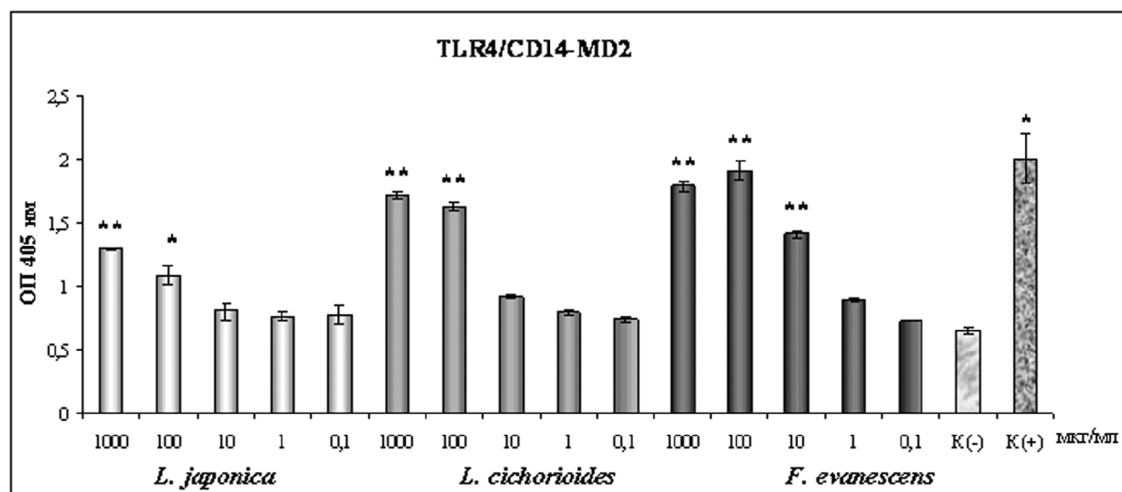


Рисунок 3.

Влияние фукоиданов на активацию транскрипционного ядерного фактора NF-κB при взаимодействии с TLR-4.

* - $p \leq 0,001$, ** - $p \leq 0,05$; ОП 405 нм - оптическая плотность (длина волны 405 нм).
К (-) контроль - клетки линии HEK293-TLR4/CD14-MD2, содержащие репортерный ген фермента β-галактозидазы под контролем NF-κB.

К (+) положительный контроль - липополисахарид *Escherichia coli* (лиганд для TLR-4).

Для доказательства того, что сульфатированные полисахариды из бурых водорослей являются самостоятельными лигандами для TLRs и не содержат в своём составе ЛПС, который специфически взаимодействует с TLR-4 и TLR-2, проведено исследование состава фукоидана из *F. evanescens*, обладающего наибольшим действием на активацию NF-κB.

Известно, что 3-гидрокситетрадекановая кислота (3-ОНС₁₄) является основным жирнокислотным компонентом большинства ЛПС. Поэтому, для определения присутствия эндотоксинов грамотрицательных бактерий в составе препарата, было проведено исследование стандартного образца метилового эфира 3-ОНС₁₄ кислоты. Установлено, что стандарт 3-ОНС₁₄ давал на хроматограмме один пик со временем удерживания (ВУ) – 10,97 мин. ГЖХ хлороформенного экстракта щелочного гидролизата фукоидана после обработки и метилирования имела набор пиков с ВУ от 6 до 39 мин, но один из пиков небольшой интенсивности имел ВУ 11,036 мин. близкий к ВУ 3-ОНС₁₄. Совместное введение стандарта и исследуемого образца показало разницу во времени удерживания между ними – 10,969 и 11,036 мин, соответственно.

С целью независимого доказательства различия этих пиков, был использован метод хромато-масс-спектрометрии. Установлено, что в стандарте 3-ОНС₁₄ присутствует основной фрагментарный ион с массой M^+ равной 103 ед., характерный для распада по связи С3-С4 при гидроксильной группе молекулы. Ни в одном из продуктов гидролиза фукоидана таких ионов нет, что свидетельствует об отсутствии 3-ОНС₁₄, а также других 3-гидроксигирных кислот, которые могут присутствовать в эндотоксинах.

Концентрация стандарта 3-ОНС₁₄ составляла 3,0 мг в 1 мл хлороформа, при введении в прибор в объёме 2 мкл это соответствует 6×10^{-6} г и даёт площадь пика 2240,5 рА. При пересчёте на молекулярную массу 3-ОНС₁₄ - 244 Да это соответствует $2,46 \times 10^{-8}$ М во введённом образце. Молекулярная масса эндотоксина составляет в среднем 10000 Да, и в нём обычно присутствует 4 остатка 3-ОНС₁₄ (10%), что позволяет определять ЛПС методом ГЖХ в количестве до $2-3 \times 10^{-7}$ М в исследуемом образце.

Результаты исследования показали, что после щелочного гидролиза исходного количества фукоидана (0,5 г) - 3-ОНС₁₄ не определяется, по крайней мере, в количестве 10⁻⁷ М. Большая величина площади пика стандарта кислоты, при отсутствии его в фукоидане, позволяет уменьшить определяемое количество еще как минимум на 1-2 порядка, т.е. до 10⁻⁸-10⁻⁹М. Таким образом, проведенное исследование с использованием методов ГЖХ и ГЖХ-МС свидетельствует об отсутствии в составе фукоидана эндотоксина.

Известно, что Toll-подобные рецепторы, расположенные на клетках врожденного иммунитета в виде гомо- и гетеродимеров (или клетки-эффекторы), не только выполняют функцию сенсоров PAMPs патогенных микроорганизмов, но и способствуют инициации иммунного ответа на эндогенные стимулы (белки теплового шока, некротический дебрис, гиалуроновую кислоту, фибриноген, домен А фибронектина, гепарансульфатные фрагменты, синтетические и природные иммуномодуляторы) [1-4]. Именно гетеродимеризация TLRs ведёт не только к расширению спектра распознаваемых лигандов, но и к изменению их функций. Так, гетеродимер TLR-2/TLR-6 участвует в распознавании пептидогликанов и диацелированных липопептидов грампозитивных бактерий и микоплазм. А образование гетеродимера TLR-1/TLR-2 позволяет распознавать триацелированные липопротеины (*Borrelia burgdorferi* OspA) [3, 13, 14].

В настоящее время доказано, что в результате специфического взаимодействия с лигандами TLRs, экспрессированные на иммунокомпетентных клетках, и в частности на дендритных клетках, индуцируют различные защитные эффекторный механизмы. В свою очередь, это приводит к активации сигнальных путей, секреции цитокинов, хемокинов, экспрессии ко-стимулирующих и МНС молекул I и II классов, необходимых для защиты организма от проникновения патогенов и формирования адаптивного иммунного ответа по Th1 или Th2 типу [1-3, 7, 8, 15].

Т-клетки также экспрессируют определенные TLRs, поэтому возможно прямое воздействие лигандов TLRs на эту субпопуляцию лимфоцитов. В частности, CD8⁺ Т-клетки экспрессируют TLR-2. Следовательно, лиганды TLR-2 способны непосредственно усиливать их пролиферацию и эффекторные функции, а также значительно снижать потребность в ко-стимулирующих сигналах от дендритных клеток (ДК). В свою очередь, увеличение секреции цитокинов ДК, а также другими клетками врожденного иммунитета, программирует дифференцировку нативных CD4⁺ в Th1 и Th2 клетки. [15, 16].

Поэтому одной из важных задач в исследовании механизмов активации TLRs, является идентификация и исследование специфических лигандов для каждого конкретного рецептора.

Полученные нами результаты *in vitro* демонстрируют, что фукоиданы из *L. japonica*, *L. cichorioides* и *F. evanescens* не содержат примеси ЛПС, о чём свидетельствуют данные газожидкостной хроматографии и ГЖХ-масс-спектрометрии, и являются лигандами для TLR-2, TLR-4 и гетеродимера TLR-2/TLR-6, вызывая активацию ядерного фактора NF-κB.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Согласно данным литературы и результатам наших исследований, фукоиданы из бурых водорослей являются лигандами для scavenger-рецепторов и активаторами системы врожденного иммунитета, а также влияют на созревание ДК. Об этом свидетельствует увеличение экспрессии TLRs, поверхностных маркерных генов, связанных с созреванием ДК (CD83, CD11c, CD38, CD86, МНС II класса), а также увеличение продукции провоспалительных и регуляторного цитокинов (TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-12), направляющих дифференцировку Т-клеток по Th1-типу [17-19].

Полученные в работе результаты исследования демонстрируют, что фукоиданы из бурых водорослей *L. japonica*, *L. cichorioides* и *F. evanescens*, обладающие выраженной иммунотропной активностью, не содержат примеси эндотоксинов грамотрицательных бактерий, являются самостоятельными

лигандами для TLRs, и вызывают активацию транскрипционного ядерного фактора NF-κB. В свою очередь, активация NF-κB, в зависимости от взаимодействия фукоиданов с конкретным рецептором, индуцирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов и IFN-индуцибельных генов, способствующих активации иммунокомпетентных клеток и является решающим фактором для формирования направления дифференцировки клеток и развития адаптивного иммунного ответа по Th1 типу.

В свете современных представлений о врождённом иммунитете, полученные нами данные являются доказательством способности сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей, обладающих широким спектром биологической активности, индуцировать генетически детерминированные биохимические процессы, которые инициируют активацию генов, ответственных за синтез цитокинов, а также способствовать формированию защиты против патогенов различных таксономических групп.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 09-04-00761a) и программ фундаментальных исследований президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" и "Фундаментальные науки медицины", а также при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 16.512.12.2013).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. (2008) Врождённый иммунитет противоопухолевый и противoinфекционный, Москва. Практическая медицина.
2. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С. (2005) Журн. микробиол., №4, 96-104.
3. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. (2007) Журн. микробиол., №4, 93-100.
4. Bhattacharjee R.N., Akira S. (2009) Аллергол. иммунол., **10**, 449-457.
5. Hochrein H., O'Keeffe M. (2008) Handb. Exp. Pharmacol., **183**, 153-179.
6. Mogensen T.H. (2009) Clin. Microbiol. Rev., **22**(2), 240-273.
7. Ward C.J. (2010) Expert Rev. Vaccines, **9**(1), 19-21.
8. Takeda K., Akira S. (2005) Int. Immunol., **17**, 1-14.
9. Gearing A.J. (2007) Immunol. Cell Biol., **85**, 490-494.
10. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. et al. (2003) J. Exp. Marine Biol. Ecol., **294**(1), 1-13.
11. Запорожец Т.С. (2006) Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия биополимеров морских гидробионтов. Дисс. докт. мед. наук, НИИЭМ, Владивосток.
12. Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E. et al. (2007) Glycobiology, **17**, 541-552.
13. Totemeyer S., Kaiser P., Maskell D.J., Bryant C.E. (2005) Infect. Immun., **73**, 1873-1878.
14. Qureshi S.T., Medzhitov R. (2003) Genes and Immunity, **4**, 87-94.
15. Beutler B. (2009) Immunol. Rev., **227**, 248-263.
16. Чикилева И.О., Караулов А.В., Анисимова Н.Ю., Киселевский М.В. (2010) Иммунология, №1, 52-55.
17. Макаренкова И.Д., Ахматова Н.К., Семенова И.Б. и др. (2010) Журн. микробиол., №5, 34-39.
18. Jin J.-O., Park H.-Y., Xu Q. et al. (2009) Blood, **113**, 5839-5847.
19. Kim M.-H., Joo H.-G. (2008) Immunol. Lett., **115**, 138-143.

Поступила: 15. 02. 2011.

SULFATED POLYSACCHARIDES OF BROWN SEaweEDS -
LIGANDS OF TOLL-LIKE RECEPTORS

*I.D. Makarenkova¹, D.Y. Logunov², A.I. Tukhvatulin², I.B. Semenova³, T.N. Zvyagintseva⁴,
V.I. Gorbach⁴, S.P. Ermakova⁴, N.N. Besednova¹*

¹Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, RAMS, Siberian Branch,
ul. Selskaya, 1, Vladivostok, 690087 Russia; e-mail: ilona_m@mail.ru

²Gamaleya Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, RAMS, Moscow

³I.I. Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Serums, RAMS, Moscow

⁴Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok

The interaction of sulfated polysaccharides - fucoidans from brown seaweeds *Laminaria japonica*, *Laminaria cichorioides* and *Fucus evanescens* with Toll-like receptors (TLRs) expressed on membranes of embryonic human kidney epithelial cells (HEK293-null, HEK293-TLR2/CD14, HEK293-hTLR4/CD14-MD2 and HEK293-hTLR2/6) was investigated. *In vitro* fucoidans specifically interacted with TLR-2, TLR-4, and the heterodimer TLR-2/6 resulted in activation of transcription nuclear factor NF- κ B. Analysis of composition the hydrolyzed fucoidan from *F. evanescens* was carried out by gas-liquid chromatography and chromatography-mass spectrometry. Results indicated the absence of 3-3-hydroxytetradecanoic acid (3-OHC₁₄), the basic component of lipopolysaccharides in the preparation. Thus, the obtained results suggested that fucoidans from brown seaweeds possessing immunotropic activity are independent ligands for TLRs, and are able to induce genetically determined biochemical processes of protection organisms against pathogenic microorganisms.

Key words: toll-like receptors, transcription nuclear factor NF- κ B, fucoidan, lipopolysaccharid, gas-liquid chromatography.