

©Коллектив авторов

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПОД ДЕЙСТВИЕМ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

И.Д. Макаренкова^{1*}, Н.К. Ахматова², С.П. Ермакова³, Н.Н. Беседнова¹

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова,
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1; эл. почта: ilona_m@mail.ru

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва

³Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова,
Дальневосточное отделение Российской академии наук, Владивосток

С использованием проточной цитофлуориметрии и фазово-контрастной микроскопии изучено влияние различных по химической структуре сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей *Fucus evanescens*, *Saccharina cichorioides* и *Saccharina japonica* на морфофункциональные изменения дендритных клеток. Установлено, что дендритные клетки характеризуются большими размерами, вакуолизированной цитоплазмой, эксцентрично расположенным ядром, наличием многочисленных цитоплазматических псевдоподий разнообразной формы и экспрессируют поверхностные маркеры, свидетельствующие о процессе их созревания (CD83, CD11c, HLA-DR, CD86). Увеличение продукции дендритными клетками иммунорегуляторного (IL-12) и провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-6) поляризует развитие иммунного ответа по Th-1 типу.

Ключевые слова: дендритные клетки, сульфатированные полисахариды, морфология, фукоиданы, цитокины

DOI 10.18097/PBMC20176301039

ВВЕДЕНИЕ

Эффекторные механизмы врождённого иммунитета реализуются с помощью различных систем иммунокомпетентных клеток, среди которых дендритные клетки (ДК) рассматриваются как ключевые элементы, обеспечивающие взаимодействие, распознавание, процессинг и презентацию антигенов Т-лимфоцитам. При этом, направленность пути активации ДК является важным компонентом, программирующим развитие адаптивного иммунного ответа по Th-1 или Th-2 типу [1-3].

Исследования последних лет направлены на изучение природных и синтетических иммунобиологических препаратов – модификаторов эффекторных функций врождённого иммунитета, которые могут стать основой для создания эффективных средств защиты организма. Изучение химического строения природных иммунобиологических препаратов и определение спектра их физиологического действия играют важную роль в области биомедицинской химии, а также создают научную основу для разработки лекарств нового поколения и биологически активных добавок к пище [1-6].

Среди природных иммуномодуляторов, особый интерес для исследования представляют водорастворимые, высоко- и низкосульфатированные, разветвленные гомо- и гетерополисахариды – фукоиданы из морских бурых водорослей, обладающие уникальной химической структурой, биосовместимостью и биodeградируемостью, низкой токсичностью и полифункциональным спектром фармакологического действия на различные системы макроорганизма [3, 6-11].

Согласно данным литературы, фукоиданы усиливают гуморальный и клеточный иммунный ответ, способствуют активации гемопоэза в красном костном мозге и пролиферативным процессам в первичных и вторичных органах иммуногенеза, Т- и В-лимфоцитов при эндотоксемии; они являются лигандами для сквенджер- и Toll-подобных рецепторов (TLR), индуцируют активацию транскрипционного ядерного фактора NF- κ B при специфическом взаимодействии с TLR-2, TLR-4 и гетеродимером TLR-2/TLR-6 человека, усиливают продукцию иммунорегуляторных и провоспалительных цитокинов [6, 7, 9, 12-14]. Именно TLR после взаимодействия с лигандами индуцируют терминальное созревание ДК. Изучение механизма действия сульфатированных полисахаридов, которые являются лигандами TLR на ключевые эффекторы врождённого иммунитета, а в частности на ДК, позволит расширить рациональный спектр их дальнейшего применения.

Цель работы – изучить влияние сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей *Fucus evanescens*, *Saccharina cichorioides* и *Saccharina japonica* на морфофункциональные изменения дендритных клеток, генерированных из моноцитов периферической крови человека.

МЕТОДИКА

Выделение и изучение химической структуры сульфатированных полисахаридов (рис. 1) проведены в ТИБОХ ДВО РАН с применением современных методов исследования [4, 8, 11].

* - адресат для переписки

<i>Fucus evanescens</i> (<i>Fucales</i>)	$[-\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 4)-\text{Fucp}-(1\rightarrow)n$ Сульфаты при C2 и C4 $1\rightarrow 3$ - α -L-Fucp и при C2 $1\rightarrow 4$ - α -L-Fucp; ацетаты в свободных положениях α -L-Fucp
<i>Saccharina cichorioides</i> (<i>Laminariales</i>)	$[-\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow)n$ 2) ↑ Fucp-(1) Сульфаты при C4 и C2 α -L-Fucp
<i>Saccharina japonica</i> (<i>Laminariales</i>)	$[-\rightarrow 3)\text{Fucp}-(1\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 4)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 4)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 3)\text{Fucp}-(1\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 4)-\text{Fucp}-(1\rightarrow 3)-\text{Fucp}-(1\rightarrow)n$ 2) 2) 4) ↑ ↑ ↑ Fucp-(1) Fucp-(1) Galp-(1→6)-Galp-(1) Сульфаты при C2 и/или C4 α -L-Fucp и при C3 и/или C4 β -D-Galp

Рисунок 1. Структурная характеристика сульфатированных полисахаридов.

1. Фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* представляет собой частично ацетилированный $1\rightarrow 3;1\rightarrow 4$ - α -L-фукан (интервал молекулярных масс (М.м.) фукоидана 40-60 кДа), сульфатированный в основном по положениям C-2 и в меньшей степени по C-4 остатков фукозы. Содержание сульфатов составляет 27%. Моносахаридный состав представлен Fuc:Gal:Xyl:Man в соотношении: 77,9:9,5:8,4:4,2 мол. %.

2. Фукоидан из бурой водоросли *S. cichorioides* представляет собой полностью сульфатированный по положениям C-2 и по C-4 остатков фукозы ($1\rightarrow 3$)- α -L-фукан (интервал М.м. 40-80 кДа). Отличается высоким содержанием сульфатных групп (39%).

3. Фукоидан из бурой водоросли *S. japonica* является частично ацетилированным $1\rightarrow 3$ - α -L-фуканом, сульфатированным в основном по положению C-4 и в меньшей степени по C-2 остатков фукозы (интервал М.м. 10-30 кДа) и отличается высоким содержанием галактозы. Моносахаридный состав представлен Fuc:Gal:Xyl:Rha в соотношении: 60:35:2:3 мол. %. Содержание сульфатов составляет 23%.

Для получения и культивирования ДК из моноцитов периферической крови здоровых доноров (n=10), использовали адаптированный метод Г.З. Чадауа и соавторов [15]. Выделенные мононуклеарные клетки (50×10^6 в 10 мл) добавляли в пластиковую чашку Петри диаметром 60 мм и оставляли для адгезии в культуральной среде, содержащей 1% эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС), при 37°C в 5% CO₂-инкубаторе, с последующим удалением не прилипших клеток. Адгезированные клетки культивировали в течение 7 дней в полной среде культивирования RPMI-1640 ("ПанЭко", Россия), содержащей 10% ЭТС, 0,1 мг/мл гентамицина сульфата ("Sigma", США), 80 нг/мл GM-CSF и 20 нг IL-4 ("BioSource International, Inc.", Бельгия). На 3 и 6 день из культурального флакона отбирали 1 мл и добавляли такой же объем свежей среды, содержащей цитокины. Для получения зрелых ДК на 7-е сутки проводили полную смену среды с добавлением в качестве индукторов созревания фукоиданы из *F. evanescens*, *S. cichorioides* и *S. japonica* (100 мкг/мл), на 9-е сутки клетки отмывали и использовали в экспериментальных целях.

Контролем служили незрелые ДК, культивируемые в присутствии только GM-CSF (20 нг/мл) и IL-4

(80 нг/мл). Положительным контролем являлись ДК, культивируемые только с классическим индуктором созревания – TNF- α (20 нг/мл, "BioSource International, Inc.").

Фазово-контрастная микроскопия культуральной взвеси и микрофотографирование ДК (с использованием моноклональных антител CD1a, CD14 и соответствующих изотипических контролей) проведена с использованием компьютерной системы AxioVision 4 и фотосистемы AxioCam HS AxioVision 4 ("Carl Zeiss", Германия).

Иммунофенотип ДК определяли с помощью моноклональных антител CD34, CD83, CD14, CD11c, CD86, HLA-DR ("Caltag Laboratories", США) против соответствующих антигенов, согласно инструкции производителя. Результаты регистрировали на проточном цитофлуориметре FacsCalibur ("Becton Dickinson", США), с использованием программного обеспечения CELLQuest. Данные анализировали после выделения в dot/plot распределении логического гейта клеточной популяции, в котором по FSC (прямое рассеивание света, направление лазерного пучка под углом 0° – определяет размер и форму клеток) и SSC (боковое рассеивание света под углом 90° – определяет структурные особенности различных популяций клеток) светорассеянию выявляли основной пул клеток. Анализировали минимум 10000 событий в гейте.

Уровень продукции цитокинов определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа в супернатантах культур ДК, генерированных из моноцитов периферической крови человека (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α ; "Вектор-Бест", Россия) с использованием тест-систем, согласно инструкциям производителей.

Статистическая обработка данных проведена с использованием программных пакетов "WinMdi 2.8" и "Statistika 7".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты цитологического исследования с помощью фазово-контрастной микроскопии показали, что после удаления неадгезированных клеток, первичная культура мононуклеарных клеток (МНК) без добавления ростовых факторов

представляет собой гетерогенную популяцию, которая состоит преимущественно из моноцитов, но также содержит лимфоциты и гранулоциты (рис. 2А). На 3-и сутки культивирования в присутствии ростовых факторов GM-CSF и IL-4 выявлены морфологические изменения клеток, которые стали приобретать округлую форму. На 6-е сутки, после повторной цитокиновой стимуляции, значительная часть клеточных колоний отделилась от дна культурального планшета. Установлено,

что полученные незрелые ДК способны к выраженной пролиферации и характеризуются большими размерами (рис. 2Б). Клетки имеют округлую форму с обширной вакуолизированной цитоплазмой и эксцентрично расположенным ядром, что согласуется с данными литературы [3].

Для созревания дендритных клеток, в клеточную культуру в качестве положительного контроля добавляли классический индуктор TNF- α (рис. 2В), а в опытные флаконы вносили различные по химической

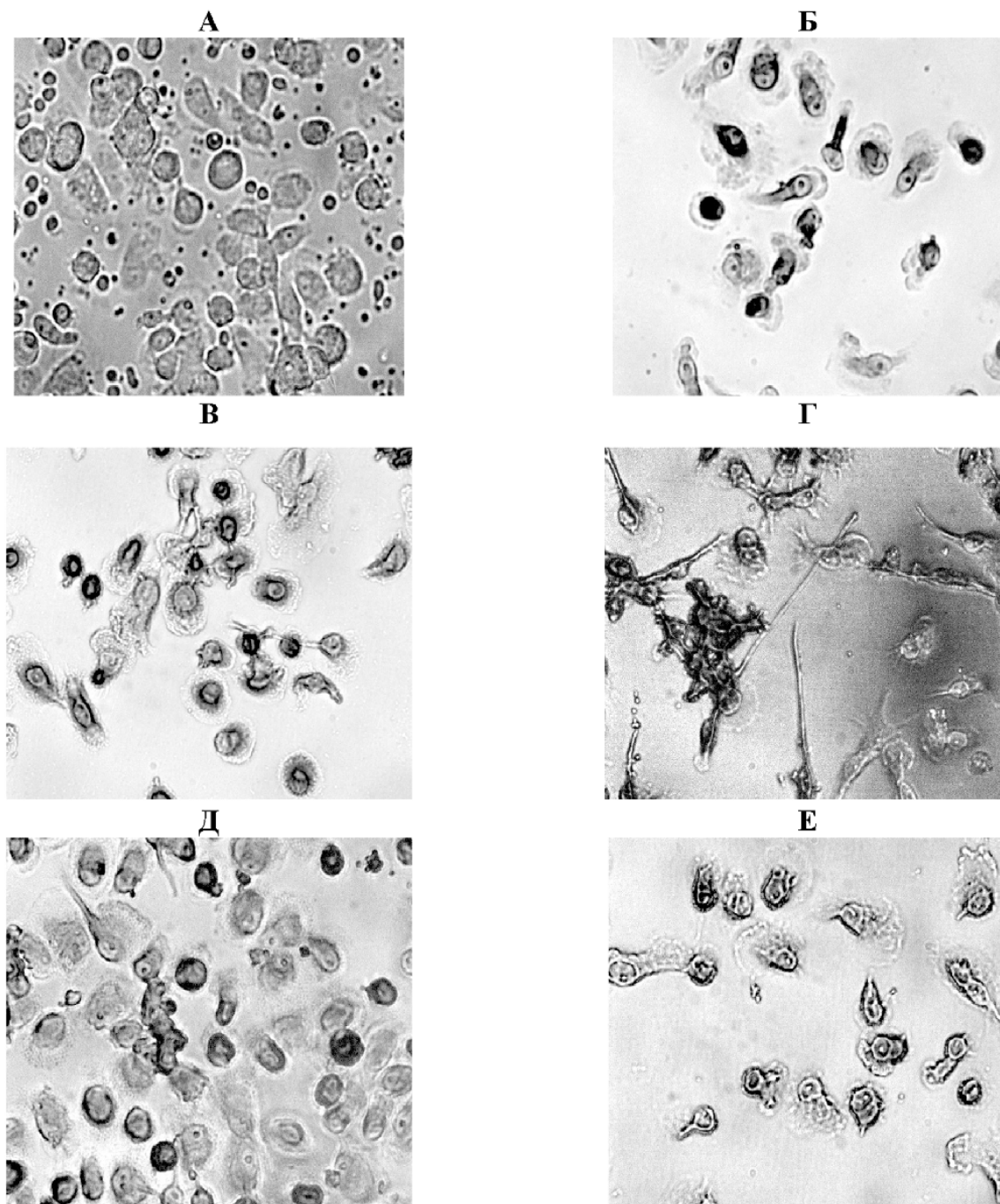


Рисунок 2. Микрофотографии дифференцировки дендритных клеток. Фазово-контрастная микроскопия культуральной взвеси с использованием системы AxioVision 4. А - первичная культура МНК; Б - ДК на 6-е сутки инкубирования в присутствии GM-CSF и IL-4; В - ДК на 9-е сутки инкубирования в присутствии TNF- α ; Г - ДК на 9-е сутки инкубирования в присутствии фукоидана из *F. evanescent*; Д - ДК на 9-е сутки инкубирования в присутствии фукоидана из *S. cichorioides*; Е - ДК на 9-е сутки инкубирования в присутствии фукоидана из *S. japonica* (ув. $\times 400$).

структуре сульфатированные полисахариды: частично ацетилированный 1→3;1→4- α -L-фукан из *F. evanescens* (рис. 2Г), полностью сульфатированный (1→3)- α -L-фукан из *S. cichorioides* (рис. 2Д) и частично ацетилированный 1→3- α -L-фукан с высоким содержанием галактозы из *S. japonica* (рис. 2Е). На 9-е сутки инкубации, все полученные клеточные культуры имели выраженные морфологические изменения, которые характеризовались появлением крупных клеток неправильной округлой формы с эксцентрично расположенным базофильным ядром, а также характерным формированием многочисленных тонких цитоплазматических псевдоподий разнообразной формы, что свидетельствует о созревании ДК.

Иммунофлуоресцентное исследование показало, что по сравнению с TNF- α (рис. 3А), фукоиданы из бурых водорослей *F. evanescens* (рис. 3Б), *S. cichorioides* (рис. 3В) и *S. japonica* (рис. 3Г) индуцируют экспрессию на ДК как CD1a,

так и CD14 – маркера моноцитов/макрофагов. При культивировании незрелых ДК с TNF- α отмечается практически только зелёное свечение, соответствующее CD1a, тогда как при применении в качестве индукторов созревания сульфатированных полисахаридов, клетки, после обработки меченными флуорохромами антителами дают как зелёное, так и двойное жёлтое свечение (CD1a/CD14). Возможно, что подобно липополисахариду (ЛПС), сульфатированные полисахариды, которые не содержат в своей структуре основной жирнокислотный компонент ЛПС – 3-гидрокситетрадекановую кислоту (3-ОНС₁₄) и другие 3-гидроксигирные кислоты [9], – увеличивают не только экспрессию CD1a, TLR-4 и костимулирующих молекул, но и индуцируют экспрессию CD14 на поверхности ДК. Однако снижение уровня CD14 как под влиянием классического индуктора – TNF- α , так и под действием фукоиданов по сравнению с незрелыми клетками, подтверждает их дифференцировку в ДК.

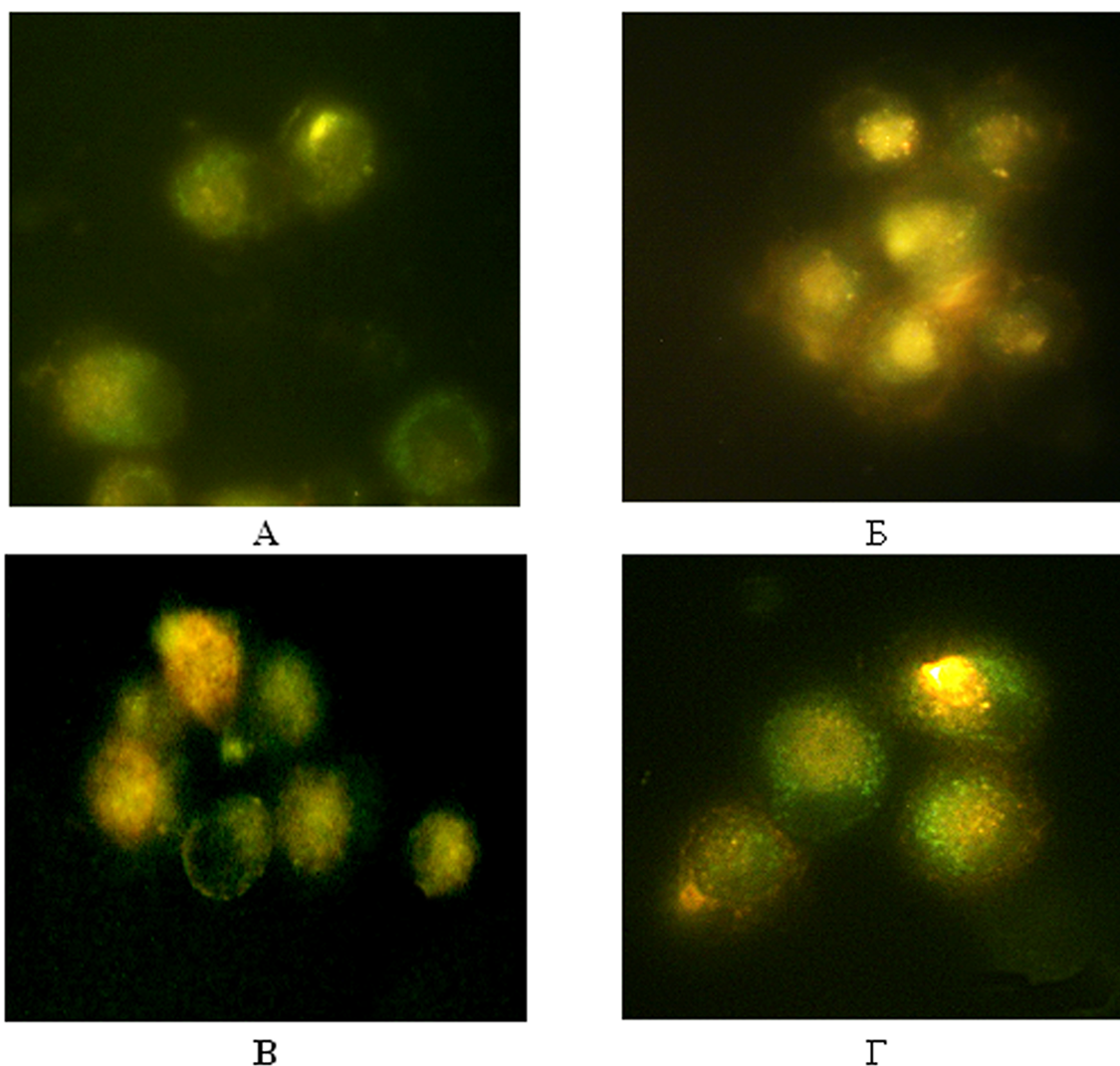


Рисунок 3. Иммунофлуоресцентное исследование ДК, созревших под действием сульфатированных полисахаридов бурых водорослей. Флуоресцентная микроскопия ДК, меченных антителами к CD1a и CD14, с использованием системы AxioVision 4. А - ДК, созревшие под действием TNF- α ; Б - ДК, созревшие под действием фукоидана из *F. evanescens*; В - ДК, созревшие под действием фукоидана из *S. cichorioides*; Г - ДК, созревшие под действием фукоидана из *S. japonica* (ув. $\times 400$).

Изучение иммунофенотипа ДК показало (рис. 4), что несмотря на различия в химической структуре, все сульфатированные полисахариды индуцировали созревание ДК. Об этом свидетельствует увеличение экспрессии маркера терминальной дифференцировки CD83 на поверхности клеток под действием фукоиданов из *F. evanescens*, *S. cichorioides* и *S. japonica* (6,9%, 12,5% и 10,03% соответственно) по сравнению с контролем (0,5%; $p \leq 0,01$) и выраженное снижение маркера незрелых ДК – CD34 (0,7; 1,4 и 0,51) в сравнении с показателями в контроле (4,54%; $p \leq 0,01$). Увеличение экспрессии CD34 и CD83 под действием TNF- α составило 0,41% и 19,24%.

Снижение экспрессии маркера моноцитов CD14 под действием фукоиданов *F. evanescens*, *S. cichorioides* и *S. japonica* (14,2%, 16,9% и 17,3% соответственно), а также TNF- α (12,4%) по сравнению с контролем (31,4%; $p \leq 0,01$) тоже свидетельствует о процессе дифференцировки моноцитов в ДК.

Огромную роль в осуществлении эффекторных функций ДК играют наследственно закодированные паттерн-распознающие рецепторы, обеспечивающие универсальное распознавание экзогенных и эндогенных лигандов, а также адгезивные, костимулирующие и антигенпредставляющие молекулы, необходимые для процессинга и презентации антигенов в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости Т-лимфоцитам [1, 2, 14].

Установленное увеличение экспрессии молекулы адгезии CD11c, указывает на способность созревших ДК взаимодействовать с Т-лимфоцитами. При этом, высокосульфатированный фукоидан из *S. cichorioides* способствовал более выраженному её увеличению (41,2%) в сравнении с частично ацетилированными сульфатированными полисахаридами из *S. japonica* (29,6%), *F. evanescens* (21,03%), TNF- α (30,03%) и незрелыми ДК (19,1%; $p = 0,01$).

Известно, что в результате процесса созревания ДК экспрессируют чрезвычайно высокое количество молекул главного комплекса гистосовместимости,

необходимых для представления антигенов, а также мембранных белков и цитокинов, необходимых для дополнительной стимуляции рекрутируемых Т-лимфоцитов [1, 2].

Увеличение экспрессии HLA-DR под действием фукоиданов из *F. evanescens*, *S. cichorioides* и *S. japonica* (22,1%, 37,79% и 29,01% соответственно), а также TNF- α (29,6%) по отношению к контролю (14,6%; $p \leq 0,01$), и костимулирующей молекулы CD86 на поверхности ДК (25,2%, 37,8% и 29,7%) по сравнению с TNF- α (32,8 %) и контролем (18,5%; $p \leq 0,05$ и $p \leq 0,01$) свидетельствует о способности созревших ДК к дальнейшей активации наивных Т-клеток, так как костимулирующий сигнал от антигенпрезентирующей клетки обеспечивает переход Т-лимфоцитов из фазы G_0 в фазу G_1 клеточного цикла.

Таким, образом, полученные результаты показали, что сульфатированные полисахариды, наряду с TNF- α , являются индукторами созревания ДК, о чём свидетельствует увеличение экспрессии маркера терминальной дифференцировки (CD83), связанного с созреванием клеток. В свою очередь, увеличение экспрессии молекул адгезии (CD11c), антигенпредставления (HLA-DR) и костимуляции (CD86) под воздействием фукоиданов может являться доказательством способности образования синапса между ДК и Т-лимфоцитами и предполагает прямое представление ДК антигенного пептида CD4⁺ Т-клеткам, что способствует их активации и дифференцировке в эффекторные Т-клетки.

Данные настоящей работы совпадают с полученными ранее результатами о влиянии сульфатированных полисахаридов бурых водорослей в системе *in vitro* на созревание и функциональную активность ДК, генерированных из костного мозга мышей линии СВА ($n=30$), что подтверждается увеличением экспрессии маркеров, связанных с созреванием клеток: CD83, CD11c, МНС II, CD86, TLR-2 и TLR-4 (табл. 1).

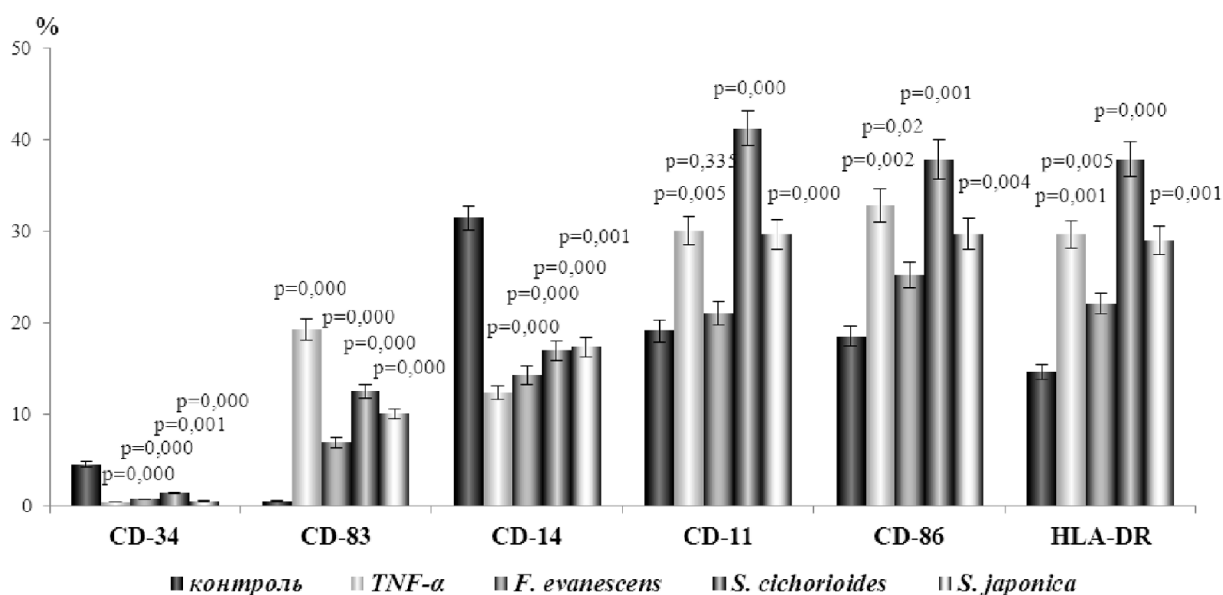


Рисунок 4. Фенотип ДК, созревших под действием сульфатированных полисахаридов.

ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ И СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ

Таблица 1. Иммунофенотип ДК, генерированных из костного мозга мышей линии СВА

Уровень экспрессии молекул, % (n=30)	Контроль Незрелые ДК (GM-CSF и IL-4)	ДК+TNF- α	ДК+S. <i>cichorioides</i>	ДК+S. <i>japonica</i>
CD34	23,23 \pm 1,42	0,19 \pm 0,27 p=0,000	0,66 \pm 0,57 p=0,000	0,24 \pm 0,24 p=0,000
CD83	0 \pm 0	27,5 \pm 2,11 p=0,000	10,27 \pm 1,10 p=0,000	16,13 \pm 2,51 p=0,000
CD38	5,43 \pm 0,25	68,70 \pm 10,86 p=0,000	58,0 \pm 6,68 p=0,000	63,67 \pm 6,65 p=0,000
CD11c	43,13 \pm 0,96	47,47 \pm 2,67 p=0,057	73,63 \pm 3,87 p=0,000	48,76 \pm 3,27 p=0,046
CD40	5,23 \pm 0,87	9,76 \pm 1,46 p=0,009	7,53 \pm 2,05 p=0,148	7,97 \pm 1,55 p=0,100
CD86	4,0 \pm 0,2	11,67 \pm 1,27 p=0,000	16,20 \pm 2,20 p=0,001	16,17 \pm 3,35 p=0,003
MHC I	2,13 \pm 0,11	8,30 \pm 1,11 p=0,000	3,43 \pm 0,38 p=0,029	3,57 \pm 0,81 p=0,038
MHC II	19,07 \pm 1,10	8,43 \pm 1,06 p=0,000	41,80 \pm 5,04 p=0,001	44,03 \pm 11,25 p=0,018
F4/80	47,46 \pm 3,61	12,76 \pm 3,28 p=0,000	24,33 \pm 6,95 p=0,007	33,0 \pm 4,33 p=0,011
TLR2	14,80 \pm 0,53	29,83 \pm 1,79 p=0,000	26,50 \pm 1,80 p=0,000	25,80 \pm 6,56 p=0,044
TLR4	1,46 \pm 0,15	5,50 \pm 0,45 p=0,000	8,13 \pm 0,15 p=0,000	7,20 \pm 1,55 p=0,003
TLR9	3,53 \pm 0,30	3,46 \pm 0,35 p=0,816	2,10 \pm 0,17 p=0,002	2,67 \pm 0,47 p=0,056

Примечание: Здесь и в таблице 2: результаты представлены в виде средней арифметической величины \pm стандартное отклонение; p - достоверность полученных значений по сравнению с незрелыми ДК (критерий Стьюдента), * - p \leq 0,05, ** - p \leq 0,01, *** - p \leq 0,001; IL - интерлейкины.

Таблица 2. Влияние сульфатированных полисахаридов на продукцию цитокинов ДК

IL (n=10)	Незрелые ДК	TNF- α	<i>F. evanescens</i>	<i>S. cichorioides</i>	<i>S. japonica</i>
IL-1 β	1,31 \pm 0,31	1,94 \pm 0,28**	1,28 \pm 0,27	1,33 \pm 0,37	1,73 \pm 0,26*
IL-12	17,65 \pm 2,75	58,82 \pm 4,79***	49,91 \pm 4,57***	48,71 \pm 3,38***	54,72 \pm 5,32***
TNF- α	20,59 \pm 3,94	59,72 \pm 5,41***	36,19 \pm 5,0***	42,72 \pm 4,82***	34,33 \pm 4,20***
IL-4	4,0 \pm 0,77	2,81 \pm 0,75*	3,72 \pm 0,65	3,78 \pm 0,57	3,40 \pm 0,86
IL-6	16,84 \pm 4,96	46,23 \pm 5,03***	39,82 \pm 3,87***	26,64 \pm 5,33***	35,21 \pm 4,05***
IL-10	2,63 \pm 0,58	6,74 \pm 0,41***	7,47 \pm 0,56***	7,83 \pm 0,93***	5,81 \pm 0,5***

Таким образом, результаты, полученные на двух альтернативных моделях, свидетельствуют о том, что сульфатированные полисахариды бурых водорослей индуцируют созревание ДК, генерированных из моноцитов периферической крови человека и костного мозга мышей, а также позволяют непосредственно на клеточном уровне установить их биологическую активность в проекции на организм человека.

Огромную роль в процессах активации, пролиферации и дифференцировки клеток, регуляции и поляризации развития иммунного ответа играет спектр продуцируемых ДК цитокинов, направляющих дифференцировку наивных CD4⁺ Т-клеток в Th-1, Th-2, Th-17 или T-reg клетки, что имеет большое значение при дифференциальной диагностике инфекционных и иммунопатологических процессов [1, 2].

Результаты исследования показали (табл. 2), что внесение в среду культивирования сульфатированных полисахаридов в качестве индукторов созревания ДК, способствует увеличению уровня цитокинов, продуцируемых как Th1, так и Th2 типа, что обеспечивает взаимосвязь между врожденным и адаптивным иммунитетом.

Исследование продукции IL-1 β показало, что только TNF- α и частично ацетилированный фукоидан из *S. japonica* с высоким содержанием галактозы способствуют незначительному увеличению

уровня цитокина в 1,48 и 1,32 раза по сравнению с контролем – незрелыми ДК.

Известно, что связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом является IL-12, играющий центральную роль в дифференцировке Т-лимфоцитов (Th-1). Установлено, что все исследуемые полисахариды обладали выраженным цитокининдуцирующим действием: фукоиданы из *F. evanescens* и *S. cichorioides* увеличивали продукцию IL-12 в 2,8 и 2,7 раза (49,91 пкг/мл и 48,71 пкг/мл), а фукоидан из *S. japonica* и TNF- α – в 3 раза (54,73 пкг/мл и 59,72 пкг/мл) и по сравнению с контролем (17,65 пкг/мл). Увеличение продукции IL-12 под действием фукоиданов в свою очередь индуцирует экспрессию молекул костимуляции (CD80/86) и главного комплекса гистосовместимости (MHC II класса), способствуют активации и дифференцировке клеток по Th-1 типу, продуцирующих IFN- γ и IL-2, а также созреванию и усилению антигенпрезентирующих свойств ДК.

Стимулирующее действие полисахаридов установлено и на продукцию TNF- α . Так, частично ацетилированные фукоиданы из *F. evanescens* и *S. japonica* увеличивали продукцию TNF- α в 1,75 и 1,67 раза (36,19 пкг/мл и 34,33 пкг/мл), а фукоидан из *L. cichorioides* – в 2 раза (42,72 пкг/мл). Самый высокий уровень продукции

TNF- α (в 2,9 раза) был установлен при добавлении в среду культивирования классического индуктора созревания ДК – TNF- α (59,72 пкг/мл) по сравнению с контролем (20,59 пкг/мл).

Установлено, что как TNF- α , так и сульфатированные полисахариды не оказывали влияния на продукцию ДК IL-4, но оказывали цитокининдуцирующее действие в отношении IL-6 и IL-10. Наибольшим действием обладали фукоиданы из *F. evanescens* и *S. japonica*, которые способствовали увеличению уровня IL-6 в 2,36 и 2 раза (39,82 пкг/мл и 35,21 пкг/мл) по сравнению с фукоиданом из *L. cichorioides* – 1,58 раза (26,64 пкг/мл) и контролем (16,84 пкг/мл). В отношении IL-10 установлено, что фукоиданы из *F. evanescens*, *S. cichorioides* и *S. japonica* увеличивают уровень цитокина в 2,84, 2,98 и 2,2 раза по сравнению с контролем. Увеличение IL-10 может свидетельствовать как об иммунорегуляторном действии фукоиданов, так и о возможном содержании в полученной клеточной генерации определенного процента незрелых ДК, обладающих толерогенными свойствами, которые необходимы для недопущения активации аутореактивных Т-клеток и дифференцировки CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в процессе иммунного ответа в Т-reg клетки [16].

Полученные нами результаты исследования различных по химической структуре сульфатированных полисахаридов согласуются с данными литературы об индуцирующем действии дериватов фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* на продукцию IL-12p70, TNF- α , IFN- γ , IL-6 макрофагами и моноцит-производными дендритными клетками. По мнению авторов, присутствие сульфатных и ацетильных групп в химической структуре полисахаридов играет важную роль в проявлении их цитокин-индуцирующего действия и направляет дифференцировку Т-клеток по Th1-типу [17].

Анализ полученных результатов показал, что в основе действия сульфатированных полисахаридов бурых водорослей лежат механизмы, обеспечивающие синтез как про-, так и противовоспалительных цитокинов, что одновременно способствует стимуляции клеточного и гуморального иммунного ответа и свидетельствует об их иммунорегуляторном действии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Данные литературы свидетельствуют о том, что сульфатированные полисахариды бурых водорослей за счёт универсальных углеводспецифических взаимодействий с мембранными рецепторами иммунокомпетентных клеток инициируют развитие различных внутриклеточных биохимических процессов [18, 19].

Результаты наших исследований показывают, что фукоиданы из *F. evanescens*, *S. cichorioides* и *S. japonica* направляют дифференцировку моноцитов периферической крови человека в ДК, о чём свидетельствуют морфологические и фенотипические изменения, связанные с процессом созревания и активации клеток.

Выраженное увеличение продукции дендритными клетками иммунорегуляторного и провоспалительных цитокинов (IL-12, TNF- α , IL-6) под действием полисахаридов свидетельствует не только о потенциале ДК к поляризации иммунного ответа по Th1 типу, но и может быть механизмом, обеспечивающим их влияние на ранние этапы инфекционного процесса, за счёт активации иммунокомпетентных клеток.

Таким образом, сульфатированные полисахариды бурых водорослей, являются активаторами врождённого иммунитета, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных парафармацевтических и лекарственных средств, для создания противоинфекционной защиты организма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. (2008) Врождённый иммунитет противоопухолевый и противоинфекционный, М.: Практическая медицина, 255с.
2. Талаев В.Ю., Плеханова М.В., Матвеев А.В. (2014) Медиаль, **2**, 135-153.
3. Кремер Е.Э. (2012) Клеточные механизмы модификации иммунного ответа при бронхиальной астме под влиянием экстракта *Opisthorchis felinus*. Автореф. дис. канд. мед. наук. Сибирский государственный медицинский университет, Томск.
4. Анастас С.Д., Звягинцева Т.Н. (2014) в кн.: Фукоиданы – сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура. Ферментативная трансформация и биологические свойства (Беседнова Н.Н., Звягинцева Т.Н., ред.), Дальнаука ДВО РАН, Владивосток, с. 60-95.
5. Kim S-Y., Joo H-G. (2015) J. Vet. Sci., **16**, 145-150.
6. Fitton J.H., Stringer D.N., Karpiniec S.S. (2015) Mar. Drugs, **13**, 5920-5946.
7. Lebedynskaya E.A., Makarenkova I.D., Lebedynskaya O.V., Akhmatova N.K., Zvyagintseva T.N. (2015) Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, **9**, 86-94.
8. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O., Krupnova T.N., Sundukova E.V., Isakov V.V. (2003) J. Exp. Mar. Biol. Ecol., **294**, 1-13.
9. Makarenkova I.D., Logunov D.Yu., Tukhvatulin A.I., Semenova I.B., Zvyagintseva T.N., Gorbach V.I., Ermakova S.P., Besednova N.N. (2012) Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, **6**(1), 75-80.
10. Wang W., Wang S.X., Guan H.S. (2012) Mar. Drugs, **10**, 2795-2816.
11. Vishchuk O.S., Tarbeeva D.V., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N. (2012) Chem. Biodivers., **9**, 817-828.
12. Fanga Q., Wang J.-F., Zhaa X.-Q., Cui S.-H., Caob L., Luo J.-P. (2015), **134**, 66-73.
13. Meng J., Cao Y., Meng Y., Luo H., Gao X., Shan F. (2014) Int. J. Biol. Macromol., **69**, 388-392.
14. Lin C.C., Pan I.H., Li Y.R., Pan Y.G., Lin M.K., Lu Y.H., Wu H.C., Chu C.L. (2015) PLoS One, **10**(2), e0116191.
15. Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А. Тамаева З.Э., Огородникова Е.В., Жордания К.И., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю. (2002) Экспериментальная биотерапия, **1**, 56-62.

16. Boks M.A., Kager-Groenland J.R., Haasjes M.S., Zwaginga J.J., van Ham S.M., ten Brinke A. (2012) Clin. Immunol., **142**, 332-342.
17. Khil'chenko S.R., Zaporozhets T.S., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Vogel U., Seeberger P., Lepenies B. (2011) Journal of Carbohydrate Chemistry, **30**, 291-305.
18. Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С. (2011) Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., **5**, 98-106.
19. Teruya T., Takeda S., Tamaki Y., Tako M. (2010) Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, **4**, 1960-1962.

Поступила: 06. 02. 2016.
Принята к печати: 20. 01. 2017.

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES OF DENDRITIC CELLS INDUCED BY SULFATED POLYSACCHARIDES OF BROWN ALGAE

I.D. Makarenkova¹, N.K. Akhmatova², S.P. Ermakova³, N.N. Besednova¹

¹Somov Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
1 Selskaya str., Vladivostok, 690087 Russia; e-mail: ilona_m@mail.ru

²Mechnikov Scientific Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow

³Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RUS Vladivostok

The effects of various sulfated polysaccharides of brown algae *Fucus evanescens*, *Saccharina cichorioides* and *Saccharina japonica* on the morphofunctional changes of dendritic cells have been investigated using flow cytometry and phase-contrast microscopy. The dendritic cells are characterized by larger sizes, vacuolated cytoplasm, eccentrically located nucleus, and also by the presence of numerous cytoplasmic pseudopodia of various shapes. They express surface markers, indicating their maturation (CD83, CD11c, HLA-DR, CD86). Increased production of immunoregulatory (IL-12) and proinflammatory TNF- α , IL-6) cytokines (by dendritic cells polarizes the development of the Th-1 type immune response.

Key words: dendritic cells, sulfated polysaccharides, morphology, fucoidan, cytokines