Биомедицинская химия, 2017 том 63, вып. 6, с. 553-558.

©Коллектив авторов

ОЦЕНКА АДЪЮВАНТНЫХ ЭФФЕКТОВ ФУКОИДАНА ИЗ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *FUCUS EVANESCENS* И ЕГО СТРУКТУРНЫХ АНАЛОГОВ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИН

Т.А. Кузнецова[1,3], Л.А. Иванушко[1], Е.В. Персиянова[1]*, А.Л. Шутикова[1], С.П. Ермакова[2], М.Ю. Хотимченко[3], Н.Н. Беседнова[1]

[1]Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, 690087, Владивосток, ул. Сельская, 1; эл. почта: helen-pers@yandex.ru
[2]Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток
[3]Дальневосточный федеральный университет, Владивосток

Использование в качестве адъювантов сульфатированных полисахаридов из бурой водоросли *Fucus evanescens* (нативный фукоидан в комплексе с полифенолами; фукоидан, освобождённый от полифенолов; продукт ферментативного гидролиза фукоидана) стимулировало формирование специфических антител к поверхностному антигену вируса гепатита В (HBs-АГ). Иммунизация мышей вакцинными композициями, содержащими HBs-АГ и образцы фукоидана, приводила к увеличению сывороточного уровня провоспалительных цитокинов (TNF-α, IFN-γ, IL-2). Усиление продукции этих цитокинов выявлено и в культуре спленоцитов при дополнительной стимуляции *in vitro* фукоиданами или фитогемагглютинином. Адъювантый эффект фукоидана и его структурных аналогов был сопоставим с действием традиционного лицензированного адъюванта гидроксида алюминия. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования сульфатированных полисахаридов из *F. evanescens* как адъювантов в составе вакцин.

Ключевые слова: сульфатированные полисахариды, фукоиданы, адъюванты вакцин, иммунитет, цитокины, гепатит В

DOI: 10.18097/PBMC20176306553

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы активно исследуются адъювантные свойства сульфатированных полисахаридов (фукоиданов). Результаты экспериментальных исследований фукоиданов свидетельствуют, что эти соединения могут быть использованы в качестве адъювантов в составе различных профилактических и терапевтических вакцин. Так, в работе Zhang и соавт. показано, что введение мышам фукоиданов из бурых водорослей *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*, *Undaria pinnatifida* и *Fucus vesiculosus* приводило к усилению продукции специфических к овальбумину иммуноглобулинов IgG1 and IgG2a, а также Т-клеточного ответа и генерации Т-клеток памяти [1]. Сульфатированные полисахариды из водорослей *Grateloupia filicina*, *Ulva pertusa* и *Sargassum qingdaoense* проявляли свойства потенциальных адъювантов для усиления иммунного ответа против вируса гриппа [2]. Выявлена адъювантная активность фукоидана из *F. vesiculosus* в отношении вакцинного штамма *Mycoplasma hyopneumoniae*, являющегося возбудителем респираторного заболевания свиней [3]. Полисахарид из *Sargassum pallidum* усиливал специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ на вакцинные антигены комбинированной вакцины против болезни Ньюкасла, инфекционного бронхита и птичьего гриппа в экспериментах на цыплятах [4].

Данные проведённых нами и соавторами многочисленных исследований, обобщённых в работе [5], свидетельствуют, что фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* обладает высокой биосовместимостью, низкой токсичностью, безопасностью для макроорганизма и оказывает различные экспериментально и клинически доказанные фармакологические эффекты (иммуномодулирующий, противовоспалительный, антикоагулянтный, противоопухолевый, гиполипидемический, гипогликемический, антиоксидантный и др.). Эти свойства определяют большие возможности конструирования препаратов для биомедицинского применения на основе этого биополимера. Однако, использование фукоиданов в качестве лекарственных препаратов, адъювантов и др. ограничено; это связано с решением вопросов получения структурно охарактеризованных и однородных образцов или их олигомерных фракций. Настоящая работа посвящена изучению иммуноадъювантной активности различных образцов фукоиданов из *F. evanescens*, в числе которых низкомолекулярная фракция со стандартными структурными характеристиками, полученная путём ферментативного гидролиза фукоидана.

Целью работы была оценка адъювантной активности фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и его структурных аналогов по отношению к антигену вируса гепатита В.

МЕТОДИКА

Исследования выполнены на мышах-самцах BALB/c массой 16-18 г, полученных из питомника лабораторных животных “Пущино”, с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции “О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях” (Страсбург, 1986). Животных выводили из опыта с использованием эфирного наркоза.

* - адресат для переписки

В качестве адъювантов использовали три образца сульфатированных полисахаридов из бурой водоросли *F. evanescens*: образец 1 – нативный фукоидан в комплексе с полифенолами с молекулярной массой 130-430 кДа [6]; образец 2 – освобождённый от полифенолов фукоидан с молекулярной массой 130-400 кДа [7]; образец 3 – продукт ферментативного гидролиза фукоидана с молекулярной массой около 9 кДа [8]. По результатам анализа данных ЯМР спектроскопии, этот образец представляет собой регулярный полисахарид следующей структуры [9]: $[\rightarrow 3)$-α-L-Fuc*p*(2,4-SO^-_3)-$(1\rightarrow 4)$-α-L-Fuc*p*(2-SO^-_3)-$(1\rightarrow]_n$.

Для контроля использовали традиционный лицензированный адъювант – гидроксид алюминия (ПИПВЭ им. М.П. Чумакова, Россия).

Иммунизацию мышей осуществляли двукратно с интервалом в 2 недели путём подкожной инъекции в холку животного суспензии рекомбинантного поверхностного антигена вируса гепатита В (HBs-АГ) (“Abcam Limited”, Великобритания) в дозе 1 мкг/мышь с фукоиданом в дозе 200 мкг/мышь или гидроксидом алюминия в дозе 100 мкг/мышь в конечном объёме 0,5 мл. Суспензию HBs-АГ с фукоиданом готовили путём смешивания или адсорбции на геле гидроксида алюминия в течение 1 ч. В качестве растворителя использовали фосфатно-буферный раствор, pH 7,2 (ФБР).

Мышей рандомизировали на 6 групп по 10-12 в каждой. Животных: 1-й группы иммунизировали вакцинной композицией HBs-АГ с фукоиданом (образец 1); 2-й группы – HBs-АГ с фукоиданом (образец 2); 3-й группы – HBs-АГ с продуктом ферментативного гидролиза фукоидана (образец 3); 4-й группы – HBs-АГ с гидроксидом алюминия; 5-й группы – HBs-АГ с ФБР; 6-й группы – ФБР в объёме 0,5 мл.

Через 2 и 4 недели от последней иммунизации у экспериментальных животных проводили тотальный отбор крови из сонных артерий и извлекали селезёнку.

В сыворотке крови определяли суммарные IgG антитела с применением тест-системы Mouse Hepatitis B surface Antibody (HBsAb) ELISA Kit (“Blue Gene Biotech”, Китай). Уровень цитокинов (TNF-α, IFN-γ, IL-2) в сыворотке крови определяли с применением тест-систем Mouse Platinum ELISA Kit (“eBioscience”, Австрия). Результаты измеряли на микропланшетном ридере Multiscan RC (“Labsystems”, Финляндия) при 450 нм.

Для выделения спленоцитов селезенку гомогенизировали, полученную взвесь клеток трижды отмывали в 10-кратном объёме среды 199. После каждой отмывки клетки осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин и доводили концентрацию клеток до 5×10^6 кл/мл. Для определения цитокинов в супернатантах клетки селезёнки мышей инкубировали в течение 48 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в полной культуральной среде с образцами фукоидана в концентрации 100 мкг/мл или фитогемагглютинина (ФГА) (“Serva”, Германия) в концентрации 10 мкг/мл. Отбирали супернатанты и определяли уровень цитокинов (TNF-α, IFN-γ, IL-2). Рассчитывали индекс стимуляции (ИС) как отношение показателя индуцированной продукции цитокина при инкубировании с фукоиданом или ФГА к показателю спонтанной продукции цитокина без препарата.

Результаты исследований подвергали статистической обработке с использованием пакета программы “Statistica-7”. Значимость различий оценивали с использованием t-критерия Стьюдента, критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p<0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунизация мышей HBs-АГ без адъюванта (5-я группа) индуцировала обнаруживаемый анти-HBs ответ (рис. 1). Так, концентрация HBs-АТ через 2 недели составила 3,56±0,27 нг/мл, а через 4 недели – 3,66±0,16 нг/мл.

Исследуемые вакцинные композиции в группах 1-4 через 2 недели активнее индуцировали выработку специфических IgG к HBs-АГ (рис. 1). Отметим, что вакцинная композиция с фукоиданом без полифенолов в группе 2 статистически значимо усиливала иммунный ответ по сравнению с неадъювированным HBs-АГ в группе 5 (контроль) ($p<0,05$). Аналогичный ответ, значимо превышающий таковой в контроле, вызвала вакцинная композиция с гидроксидом алюминия (группа 4). Значимых различий в уровне HBs-АТ у животных опытных групп 1-3 по сравнению с группой 4, не выявлено.

Через 4 недели после иммунизации в 1-4 группах отмечен более выраженный иммунный ответ, чем через 2 недели (рис. 1). Так, в 1-й группе концентрация антител в сыворотке повысилась с 4,19±0,24 нг/мл (через 2 недели) до 5,09±0,38 нг/мл (через 4 недели) ($p<0,05$). Вакцинные композиции с фукоиданами и гидроксидом алюминия в 1-4 группах индуцировали статистически значимое повышение концентрации специфических антител по сравнению с антигеном без адъюванта (5-я группа). Значимых различий в уровне HBs-АТ у животных 1-3 групп, вакцинированных композициями с фукоиданами разной степени очистки, структуры и молекулярной массы, в сравнении с группой 4, не выявлено.

Анализ содержания цитокинов в сыворотке крови иммунизированных мышей показал, что концентрация TNF-α и IFN-γ во всех группах статистически значимо превышала соответствующие показатели у интактных животных (6-я группа). Через 2 недели наибольший уровень TNF-α и IFN-γ зарегистрирован у животных 1-й группы, значимо превышая показатели не только в 5-й группе, но и во 2-4 группах ($p<0,05$). Через 4 недели уровень всех исследуемых цитокинов в сыворотке крови возрастал по сравнению с их содержанием через 2 недели. При сравнении содержания цитокинов в сыворотке крови у животных опытных групп, иммунизированных HBs-АГ с адъювантами, установлено, что большинство показателей концентрации цитокинов статистически значимо превышало таковые в контрольной 5-й группе (рис. 2).

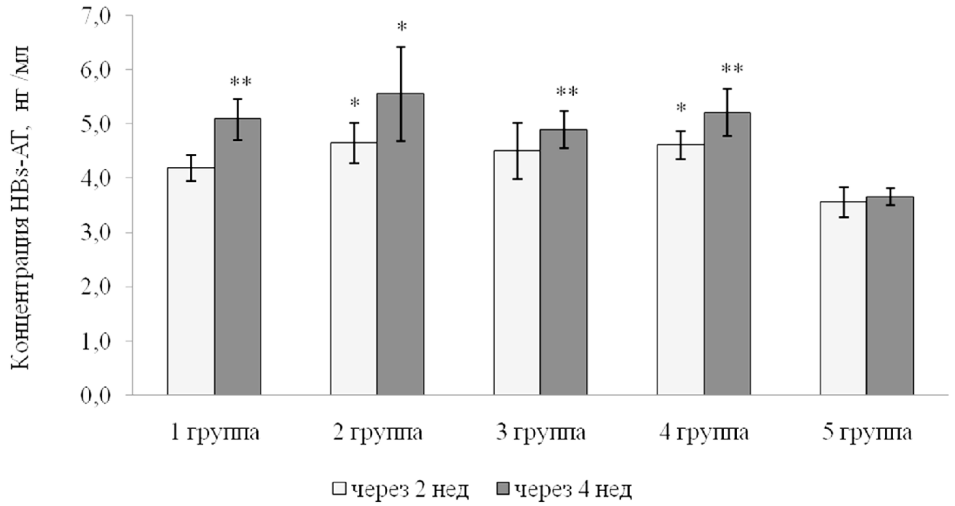

Рисунок 1. Динамика иммунного ответа мышей BALB/c, иммунизированных поверхностным антигеном вируса гепатита В. Данные представлены в виде средней величины ± ошибка средней (n=6); * - различия значимы по отношению к контролю (5-я группа), * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$. Здесь и на рисунке 2: 1 - нативный фукоидан с полифенолами; 2 - фукоидан, освобожденный от полифенолов; 3 - низкомолекулярный продукт ферментативного гидролиза фукоидана; 4 - гель гидроксида алюминия; 5 - без адъюванта (контрольная группа). Сыворотки получали через 2 недели и через 4 недели после повторной иммунизации мышей.

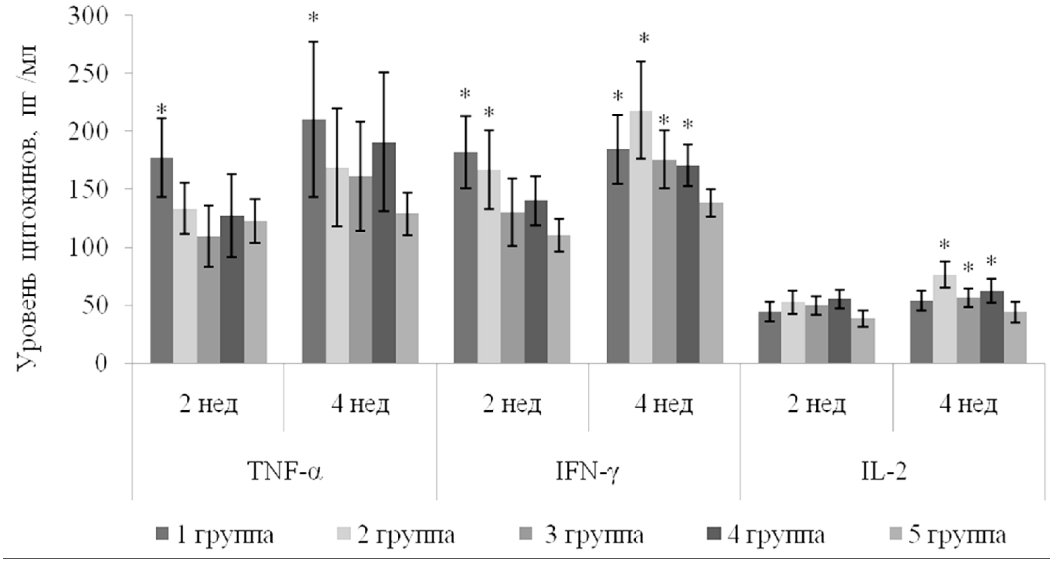

Рисунок 2. Влияние образцов фукоидана на продукцию цитокинов в сыворотке крови мышей BALB/c, иммунизированных поверхностным антигеном вируса гепатита В. Данные представлены в виде средней величины ± ошибка средней (n=5); * - различия значимы по отношению к контролю (5-я группа), $p<0,05$.

На следующем этапе нами было проведено исследование продукции цитокинов в культуре спленоцитов, что отражает функциональное состояние этих клеток. Уровень спонтанной продукции цитокинов спленоцитами интактных мышей был невысоким (таблица). Для оценки резервных возможностей спленоцитов иммунизированных мышей 1-5 групп в отношении продукции цитокинов мы осуществляли дополнительную стимуляцию этих клеток *in vitro* фукоиданами или Т-клеточным митогеном ФГА.

Продукция цитокинов в супернатантах спленоцитов, полученных через 2 недели после иммунизации мышей, и дополнительно стимулированных соответствующими образцами фукоиданов или ФГА, значительно усиливалась по сравнению со спонтанной продукцией. Так, ИС продукции TNF-α при стимуляции фукоиданами составили от 5,6 (5-я группа) до 15,3 (1-я группа), а при стимуляции ФГА – от 6,3 (5-я группа) до 17,4 (3-я группа). ИС продукции IFN-γ при стимуляции фукоиданами составили от 3,2 (5-я группа) до 7,6 (3-я группа), а при стимуляции ФГА – от 3,8 (5-я группа) до 12,4 (3-я группа). Более низкие значения ИС отмечены при анализе продукции IL-2, которые под влиянием фукоиданов составили от 1,2 (5-я группа) до 1,6 (2-я группа), а при стимуляции ФГА – от 3,2 (5-я группа) до 6,4 (2-я группа) (таблица).

Таблица. Содержание цитокинов в супернатантах селезёнок мышей BALB/c (n=5) после иммунизации антигеном вируса гепатита В

Цитокины		Уровень цитокинов (пг/мл)										
		Спонтанная продукция	Стимуляция фукоиданами					Стимуляция ФГА				
		6-я группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа	5-я группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа	5-я группа
А	TNF-α	25,4 ±7,2	388,6 ±88,3*	267,2 ±65,3*	237,3 ±83,1*	243,5 ±66,4*	141,1 ±27,1	410,7 ±75,3*	341,5 ±60,7*	440,8 ±64,3*	378,1 ±44,7*	160,6 ±30,8
	ИС		15,3	10,5	9,4	9,6	5,6	16,2	13,4	17,4	14,9	6,3
	IFN-γ	94,3 ±18,8	693,4 ±77,2*	669,9 ±80,5*	719,6 ±55,6*	411,7 ±48,5*	305,4 ±40,7	883,5 ±81,4*	729,7 ±65,2*	1169,3 ±90,1*	624, 4±55,3*	360,6 ±44,1
	ИС		7,4	7,1	7,6	4,4	3,2	9,4	7,7	12,4	6,6	3,8
	IL-2	12,2 ±3,2	18,3 ±4,7	19,5 ±4,5	17,6 ±4,1	17,1 ±3,3	14,1 ±3,4	55,3 ±10,5*	78,7 ±20,1*	53,5 ±12,2	45,4 ±10,6*	38,6 ±7,2
	ИС		1,5	1,6	1,4	1,4	1,2	4,5	6,4	4,4	3,7	3,2
Б	TNF-α	28,7 ±8,1	389,3 ±57,2*	383,6 ±44,7*	462,9 ±60,1*	477,1 ±57,3*	167,8 ±35,6	610,5 ±62,4	567,6 ±60,1	720,7 ±61,5*	625,6 ±50,3	577,2 ±48,6
	ИС		13,6	13,2	15,9	16,6	5,9	21,3	19,5	24,8	21,5	19,9
	IFN-γ	83,3 ±10,1	932,7 ±70,2*	741,8 ±65,3*	962,5 ±80,1*	694,7 ±77,2*	496,4 ±48,3	1355,4 ±82,2*	831,5 ±74,1*	853,7 ±72,3*	878,7 ±67,7*	521,4 ±45,4
	ИС		11,2	8,9	11,6	8,4	5,9	16,3	9,9	10,3	10,6	6,3
	IL-2	13,4 ±3,2	21,8 ±5,5	27,6 ±4,7*	24,1 ±4,9*	26,9 ±5,1*	17,7 ±3,6	87,5 ±9,1*	82,6 ±7,3*	88,4 ±6,1*	61,5 ±6,4	47,9 ±6,3
	ИС		1,6	2,1	1,8	2,0	1,32	6,5	6,2	6,6	4,6	3,6

Примечание. Данные представлены в виде средней величины ± ошибка средней. А - содержание цитокинов через 2 недели после иммунизации, Б - через 4 недели после иммунизации; ИС - индекс стимуляции; ФГА - фитогемагглютинин; * - различия значимы по отношению к контролю (5 группа), $p<0,05$.

Анализ межгрупповых различий в продукции цитокинов показал, что концентрация TNF-α и IFN-γ в супернатантах спленоцитов, полученных от животных 1-4 групп через 2 недели, значимо превышала таковую в 5-й группе ($p<0,05$), показатели продукции IL-2 во всех группах были сопоставимы.

Сравнение уровня TNF-α в супернатантах спленоцитов от животных 1-3 групп по отношению к 4-й группе показало, что в наибольшей степени увеличивалась концентрация этого цитокина в группе 1 ($p<0,05$). Аналогичное сравнение уровня IFN-γ позволило выявить более высокий уровень этого цитокина в группах 1 и 3 по сравнению с 4-й группой.

Продукция цитокинов в супернатантах спленоцитов иммунизированных мышей через 4 недели, в основном, повторяла вышеописанную динамику, но была несколько интенсивнее, чем через 2 недели (таблица).

Следует отметить, что концентрация всех исследуемых цитокинов в супернатантах спленоцитов мышей 1-5 групп под действием *in vitro* ФГА превышала соответствующие показатели при стимуляции фукоиданами, то есть ФГА интенсивнее, чем фукоиданы стимулировал резервные возможности активации клеток.

Иммуногенность или способность вызывать в организме образование антител – интегральный показатель для оценки эффективности инактивированных вакцин против вирусных заболеваний (гепатита В, гриппа и др.), который коррелирует с уровнем защиты от инфекции.

Наши результаты показали, что добавление фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* и его структурных аналогов в качестве адъювантов к HBs-АГ значительно повышает его иммуногенность. Адъювантное действие образцов фукоидана было сопоставимо с таковым традиционного лицензированного адъюванта гидроксида алюминия.

Важнейшим свойством адъювантов в составе противовирусных вакцин является способность к поляризации иммунного ответа в сторону Т-хелперов (Тх1). Такую способность проявляют агонисты toll-like рецепторов (TLR) [10].

Ранее было показано, что фукоидан из водоросли *F. evanescens* вызывает активацию ядерного фактора NF-κB, специфически связываясь с TLR-2 и TLR-4, обеспечивая транскрипцию и индукцию генов провоспалительных цитокинов, способствующих активации иммунокомпетентных клеток и развитию адаптивного иммунного ответа на различные антигены по Тх1 типу [11]. Было установлено, что фукоиданы индуцируют повышение уровня провоспалительных (TNF-α, IL-2, IL-6, IL-17) и иммунорегуляторных (IL-12, IFN-γ) цитокинов,

но ингибируют продукцию противовоспалительного цитокина TGF-β, что также подтверждает поляризацию иммунного ответа по Tx1-типу [12].

Нами выявлено повышение сывороточных уровней провоспалительных цитокинов (IFN-γ, TNF-α, IL-2) у мышей, иммунизированных вакцинными композициями, содержащими HBs-АГ с образцами фукоидана по сравнению с группой животных, иммунизированных только HBs-АГ. В супернатантах спленоцитов иммунизированных животных, стимулированных разными образцами фукоидана, также выявлено увеличение уровня провоспалительных цитокинов TNF-α, IFN-γ и IL-2, преимущественно синтезируемых Tx1 и способствующих развитию Т-клеточного иммунного ответа.

Показанная в ряде работ способность фукоиданов стимулировать клеточный иммунитет [1, 13] является преимуществом при их использовании в качестве адъювантов в отличие от адъювантов на основе алюминия.

Как известно, соединения алюминия характеризуются несовершенством механизмов адъювантной активности. Одним из путей реализации их адъювантности является адсорбция антигена за счёт ионного взаимодействия и создания депо антигенов, что, однако, не обеспечивает существенного усиления иммунного ответа [14]. Под влиянием гидроксида алюминия происходит интенсивная продукция IL-4, угнетающего развитие Tx1, но способствующего дифференцировке Tx2 [15]. Адъюванты на основе соединений алюминия индуцируют относительно кратковременное образование антител (что требует повторной вакцинации) и обладают слабой способностью к индукции клеточного иммунного ответа. Кроме того, при вакцинации увеличивается риск аллергии и анафилаксии [16].

Вакцины против гепатита В получают на основе поверхностного антигена (HBs-АГ) с применением генно-инженерной технологии. Для усиления иммуногенности этого антигена в состав вакцин входят разные адъюванты. В качестве адъюванта большинство вакцин против гепатита В содержит гидроксид алюминия. Этот адъювант, как отмечено выше, имеет ряд недостатков. В настоящее время в составе вакцин против гепатита В помимо гидроксида алюминия применяют современные адъюванты. Так, вакцина Fendrix (“GlaxoSmithKline”, Бельгия) содержит AS04 (комбинацию алюминия и монофосфорил-липида А – MPL® – очищенное, детоксицированное производное бактериальных липополисахаридов) [17, 18], вакцина Supervax™ (“Berna Biotech”, Швейцария) содержит синтетические MPL (RC-529) [19, 20], рекомбинантная векторная вакцина Engerix-B (“GlaxoSmithKline”) содержит CpG DNA-олигодезоксинуклеотиды – короткие одноцепочечные синтетические молекулы ДНК [21]. Из соединений полисахаридной природы в качестве адъювантов активно исследуется хитозан и альгинат натрия [22]. На этапе клинических испытаний в качестве адъюванта в настоящее время находится природная полисахаридная композиция Advax™ – производное инулина-дельта (δ), а также Алгаммулин – комбинация инулина-гамма (γ) с гидратом окиси алюминия. Advax™ успешно испытан в составе ряда вакцин, в том числе против вирусов гепатита, гриппа, папилломы человека, герпеса, ВИЧ [23, 24].

Полученные нами данные показывают возможность использования фукоидана из *F. evanescens* и структурных аналогов в качестве эффективных (высоко иммуногенных) и безопасных адъювантов в составе противовирусных вакцин, в том числе и против гепатита В.

Сравнительная оценка адъювантной активности образцов фукоиданов из *F. evanescens* (нативного фукоидана в комплексе с полифенолами, высокоочищенного фукоидана и продукта ферментативного гидролиза фукоидана) свидетельствует, что эти полисахариды обладают сопоставимыми показателями иммуноадъювантного потенциала. Ранее нами было сделано аналогичное заключение относительно влияния этих образцов фукоиданов на эффекторные функции клеток врождённого иммунитета [25].

Исследованные образцы фукоидана могут быть рекомендованы к дальнейшему изучению в качестве безопасных и эффективных адъювантов в составе вакцинных препаратов.

Значительный практический интерес представляет образец, полученный путём ферментативного гидролиза фукоидана и имеющий стабильную воспроизводимую структуру.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

1. Установлено, что фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* и его структурные аналоги (нативный фукоидан в комплексе с полифенолами, высокоочищенный фукоидан и продукт ферментативного гидролиза фукоидана), различающиеся по структуре и молекулярной массе, повышают иммуногенность HBs-АГ.

2. При иммунизации мышей вакцинными композициями, содержащими HBs-АГ и исследуемые образцы фукоидана, наблюдается увеличение сывороточного уровня провоспалительных цитокинов, преимущественно синтезируемых Tx1 и способствующих развитию Т-клеточного иммунного ответа (TNF-α, IFN-γ, IL-2), а также усиление продукции этих цитокинов в культуре спленоцитов при дополнительной стимуляции *in vitro* фукоиданами или ФГА.

3. Исследованные образцы фукоиданов из *F. evanescens* (нативный фукоидан в комплексе с полифенолами, высокоочищенный фукоидан и продукт ферментативного гидролиза фукоидана) обладают сопоставимыми показателями иммуноадъювантного потенциала.

4. Адъювантый эффект фукоидана и его структурных аналогов был сопоставим с действием традиционного лицензированного адъюванта гидроксида алюминия.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что фукоидан из *F. evanescens* и его модифицированные структурные аналоги могут функционировать в качестве эффективных адъювантов в составе противовирусных вакцин, в частности, против гепатита В.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Zhang W.***,** *Oda T., Yu Q., Jin J.O*. (2015) Mar. Drugs, **13**, 1084-1104.
2. *Song L., Chen X., Liu X., Zhang F., Hu L., Yue Y., Li K., Li P*. (2016) Mar. Drugs, **14**, 17 p. DOI: 10.3390/md14010004.
3. *Kim S.Y., Joo H.G*. (2015) J. Vet. Sci., **16**, 145-150.
4. *Li L.J., Li M.Y., Li Y.T., Feng J.J., Hao F.Q., Lun Z*. (2012) Mar. Drugs, **10**, 2648-2660.
5. *Menshova R.V., Shevchenko N.M., Imbs T.I., Zvyagintseva T.N., Malyarenko O.S., Zaporoshets T.S., Besednova N.N., Ermakova S.P*. (2016) Frontiers in Marine Science, **3**, 1-9.
6. *Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N*. (2012) Carbohydr. Res., **358**, 78-81.
7. *Imbs T.I., Skriptsova A.V., Zvyagintseva T.N*. (2015) J. Appl. Phycol., **27**, 545-553.
8. *Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Kurilenko V.V., Zakharenko A.M., Isakov V.V., Zaporozhets T.S., Gazha A.K., Zvyagintseva T.N*. (2013) Mar. Drugs, **11**, 2413-2430.
9. *Silchenko A.S., Ustyuzhanina N.E., Kusaykin M.I., Krylov V.B., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Usoltseva R.V., Zueva A.O., Nifantiev N.E., Zvyagintseva T.N*. (2017) Glycobiology, **27**, 254-263.
10. *Napolitani G., Rinaldi A., Bertoni F., Sallusto F., Lanzavecchia A*. (2005) Nat. Immunol., **6**, 769-776.
11. *Макаренкова И.Д., Логунов Д.Ю., Тухватулин А.И., Семенова И.Б., Звягинцева Т.Н., Горбач В.И., Ермакова С.П., Беседнова Н.Н.* (2012) Биомед. химия, **58**, 318-325. DOI: 10.18097/pbmc20125803318.
12. *Макаренкова И.Д.* (2012) Цитокины и воспаление, **11**, 34-40.
13. *Jin J.O., Zhang W., Du J.Y., Wong K.W., Oda T., Yu Q*. (2014) PLoS One, **9**, e99396. DOI: 10.1371/journal.pone.0099396.
14. *García A., De Sanctis J.B*. (2014) APMIS, **122**, 257-267.
15. *Cunningham A.F., Serre K., Toellner K.-M., Khan M., Alexander J., Brombacher F., MacLennan I.C.M*. (2004) Eur. J. Immunol., **34**, 686-694.
16. *Terhune T.D., Deth R.C*. (2013) J. Immunotoxicol., **10**, 210-222.
17. *Kundi M*. (2007) Expert Rev. Vaccines, **6**, 133-140.
18. *Beran J., Hobzova L., Wertzova V., Kuriyakose S., Leyssen M., Surquin M., Houard S*. (2010) Hum. Vaccin., **6**, 578-584.
19. *Dupont J., Altclas J., Lepetic A., Lombardo M., Vázquez V., Salgueira C., Seigelchifer M., Arndtz N., Antunez E., von Eschen K., Janowicz Z*. (2006) Vaccine, **24**, 7167-7174.
20. *Tong N.K., Beran J., Kee S.A., Miguel J.L., Sanchez C., Bayas J.M., Vilella A., de Juanes J.R., Arrazola P., Calbo-Torrecillas F., de Novales E.L., Hamtiaux V., Lievens M., Stoffel M*. (2005) Kidney Int., **68**, 2298-2303.
21. *Cooper C.L., Davis H.L., Morris M.L., Efler S.M., Adhami M.A., Krieg A.M., Cameron D.W., Heathcote J*. (2004) J. Clin. Immunol., **24**, 693-701.
22. *AbdelAllah N.H., Abdeltawab N.F., Boseila A.A., Amin M.A*. (2016) Evid. Based Complement. Alternat. Med., **2016**, Article ID 7659684. DOI: 10.1155/2016/7659684.
23. *Gordon D.L., Kelley P., Heinzel S., Cooper P., Petrovsky N*. (2014) Vaccine, **32**, 6469-6477.
24. *Petrovsky N., Cooper P.D*. (2015) Vaccine, **33**, 5920-5926.
25. *Кузнецова Т.А., Смолина Т.П., Беседнова Н.Н., Сильченко А.С., Имбс Т.И., Ермакова С.П.* (2016) Антибиот. химиотер., **61**, 10-14.

Поступила: 21. 07. 2017.
Принята к печати: 24. 10. 2017.

EVALUATION OF ADJUVANT EFFECTS OF FUCOIDANE FROM BROWN SEAWEED *FUCUS EVANESCENS* AND ITS STRUCTURAL ANALOGUES FOR THE STRENGTHENING VACCINES EFFECTIVENESS

T.A. Kuznetsova[1,3], L.A. Ivanushko[1], E.V. Persiyanova[1], A.L. Shutikova[1], S.P. Ermakova[2], M.Yu. Khotimchenko[3], N.N. Besednova[1]

[1]Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
1 Selskaya str., Vladivostok, 690087 Russia; e-mail: helen-pers@yandex.ru
[2]Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Vladivostok, Russia
[3]Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

The use of sulfated polysaccharides from brown seaweed *Fucus evanescens* as adjuvants (native fucoidan in combination with polyphenols, fucoidan without polyphenols, a product of enzymatic hydrolysis of fucoidan) stimulated the formation of specific antibodies to the surface antigen of the hepatitis B virus (HBs-AG). Immunization of mice with vaccine compositions containing HBs-AG and fucoidan samples resulted in increasing the serum level of the pro-inflammatory (TNF-α, IFN-γ, IL-2) cytokines. Increased production of these cytokines was detected in the culture of splenocytes additionally stimulated *in vitro* by fucoidans or phytohemagglutinin. The adjuvant effect of fucoidan and its structural modifications was comparable to that of the traditional licensed adjuvant aluminum hydroxide. The obtained results indicate a promising use of sulfated polysaccharides from *F. evanescens* as vaccine adjuvants.

Key words: sulfated polysaccharides, fucoidans, vaccines adjuvants, immunity, cytokines, hepatitis B