



Влияние ферментативно деполимеризованного фукоидана на эффекторные функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета

Т.А. Кузнецова^{1,✉}, Т.П. Смолина¹, Е.В. Персиянова¹, Л.А. Иванушко¹,
А.С. Сильченко², С.П. Ермакова², Н.Н. Беседнова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Сельская, д. 1, г. Владивосток, 690087, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения Российской академии наук, пр. 100-летия Владивостока, д. 159, г. Владивосток, 690022, Российская Федерация

✉ Кузнецова Татьяна Алексеевна; takuznets@mail.ru

Резюме

Использование сульфатированных полисахаридов (фукоиданов) в качестве фармацевтических субстанций или адъювантов связано с решением задачи по получению структурно охарактеризованных и однородных образцов или их олигомерных фракций, сохраняющих высокую биологическую активность. Нами получен высокоочищенный продукт ферментативного гидролиза фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и дана оценка биологической активности полученного продукта в сравнении с нативным фукоиданом. **Цель работы:** изучение влияния ферментативно деполимеризованного образца фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* на эффекторные функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета *in vitro* и *in vivo* в условиях антигенной нагрузки овальбумином (ОВА) в сравнении с нативным фукоиданом. **Материалы и методы:** для оценки влияния образцов фукоиданов (ферментативно деполимеризованного и нативного) *in vitro* на уровень экспрессии основных иммунофенотипических маркеров клеток врожденного и адаптивного иммунитета (нейтрофилов, натуральных киллеров, моноцитов, лимфоцитов) применяли методы проточной цитометрии. В экспериментах *in vivo* в сыворотке крови мышей линии BALB/c, иммунизированных ОВА, исследовали уровень специфических антител IgG, IgG1, IgG2a и цитокинов (IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12). Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы Statistica 10. **Результаты:** под влиянием обоих образцов фукоиданов *in vitro* выявлены изменения уровня экспрессии основных иммунофенотипических маркеров клеток врожденного и адаптивного иммунитета, свидетельствующие об их активации. В условиях *in vivo* под действием образцов фукоиданов наблюдалось увеличение уровня ОВА-специфических антител (IgG, IgG1, IgG2a) и продукции цитокинов (IFN- γ , IL-2, IL-10). **Выводы:** показана активация образцом ферментативно деполимеризованного фукоидана врожденного и адаптивного иммунитета, которая не уступает действию нативного образца фукоидана, что определяет возможность его применения в качестве адъюванта для широкого спектра профилактических и терапевтических вакцин.

Ключевые слова: фукоиданы; адъюванты; вакцины; врожденный иммунитет; адаптивный иммунитет; овальбумин

Для цитирования: Кузнецова Т.А., Смолина Т.П., Персиянова Е.В., Иванушко Л.А., Сильченко А.С., Ермакова С.П., Беседнова Н.Н. Влияние ферментативно деполимеризованного фукоидана на эффекторные функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(3):308–317. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-308-317>

Effects of enzymatically depolymerised fucoidan on effector functions of innate and adaptive immunity cells

T.A. Kuznetsova^{1,✉}, T.P. Smolina¹, E.V. Persiyanova¹, L.A. Ivanushko¹, A.S. Silchenko², S.P. Ermakova², N.N. Besednova¹

¹ G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology, Rospotrebnadzor, 1 Selskaya St., Vladivostok 690087, Russian Federation

² G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 159 100-letiya Vladivostoka Ave, Vladivostok 690022, Russian Federation

✉ Tatyana A. Kuznetsova; takuznets@mail.ru

Abstract

The use of sulfated polysaccharides (fucoidans) as active pharmaceutical ingredients or adjuvants poses the challenge of obtaining structurally characterised and homogeneous samples or their oligomeric fractions maintaining high biological activity. The authors obtained a highly purified enzymatic hydrolysate of fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and compared its biological activity with that of a native sample. **The aim of the study** was to compare, *in vitro* and *in vivo*, the effects of depolymerised fucoidan from the brown alga *F. evanescens* and native fucoidan on the effector functions of innate and adaptive immunity cells loaded with ovalbumin (OVA). **Materials and methods:** the effects of the fucoidan samples (depolymerised and native) on the expression of the main immunophenotypic markers by innate and adaptive immunity cells (neutrophils, monocytes, natural killers, and lymphocytes) were studied *in vitro* using flow cytometry. The levels of serum OVA-specific antibodies (IgG, IgG1, IgG2a) and cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12) were studied *in vivo* using BALB/c mice immunised with OVA. The statistical analysis of the data obtained was performed using the Statistica 10 software package. **Results:** *in vitro*, both fucoidan samples altered the expression of the main immunophenotypic markers by innate and adaptive immunity cells, indicating their activation. *In vivo*, mice treated with the fucoidan samples demonstrated an increase in the levels of OVA-specific antibodies (IgG, IgG1 and IgG2a) and in the production of cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-10). **Conclusions:** the effects of enzymatically depolymerised fucoidan on functional activity of innate and adaptive immunity cells are comparable to those of native fucoidan. The findings indicate the possibility of using enzymatic hydrolysis products of fucoidan as adjuvants for a wide range of prophylactic and therapeutic vaccines.

Key words: fucoidans; adjuvants; vaccines; innate immunity; adaptive immunity; ovalbumin

For citation: Kuznetsova T.A., Smolina T.P., Persiyanova E.V., Ivanushko L.A., Silchenko A.S., Ermakova S.P., Besednova N.N. Effects of enzymatically depolymerised fucoidan on effector functions of innate and adaptive immunity cells. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(3):308–317. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-3-308-317>

Введение

Фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens* обладает высокой биосовместимостью, низкой токсичностью, безопасностью для макроорганизма и проявляет иммуномодулирующую, противовоспалительную, антикоагулянтную, противоопухолевую, гипополипидемическую, гипогликемическую, антиоксидантную активность [1]. Это открывает большие возможности конструирования препаратов для биомедицинского применения на основе фукоиданов. В то же время фукоиданы до сих пор не используются в качестве фармацевтических субстанций, адъювантов и др. В основе стратегии по их разработке находится создание стандартизованных препаратов фукоидана с установленной структурой.

Стандартизация препаратов полисахаридов бурых водорослей весьма проблематична в силу ряда причин. Так, разные виды бурых водорослей синтезируют различающиеся по строению полисахариды. Кроме того, каждый вид водоросли синтезирует характерный для него набор полисахаридов, содержащий несколько структурных типов фукоиданов, ламинаранов и альгиновых кислот. Состав и структура полисахаридов зависят от вида и сезона сбора водоросли и от ее репродуктивного статуса. Имеют значение условия процессов обработки водоросли и экстракции полисахаридов при получении биополимеров [1, 2].

Одним из подходов к решению задачи по получению структурно охарактеризованных и однородных образцов или их олигомерных фракций, сохраняющих высокую биологическую активность, является использование ферментов, деполимеризующих фукоиданы. В частности, с помощью фукоиданазы из морской бактерии *Formosa algae* КММ 3553Т получен высокоочищенный продукт ферментативного гидролиза фукоидана из *Fucus evanescens* [2].

Цель работы – изучение влияния ферментативно деполимеризованного образца фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* на эффекторные функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета *in vitro* и *in vivo* в условиях антигенной нагрузки овальбумином (ОВА) в сравнении с нативным фукоиданом.

Материалы и методы

Получение и анализ образцов фукоиданов

В работе использовали два образца фукоиданов, выделенных из бурой водоросли *Fucus evanescens*: ферментативно деполимеризованное производное фукоидана (образец 1) [2]

и нативный фукоидан в комплексе с полифенолами (образец 2) [3]. Для получения продукта ферментативного гидролиза (образец 1) 1 г нативного фукоидана растворяли в 98 мл раствора фермента рекомбинантной фукоиданазы FFA1 (0,001 мг/мл) из штамма морской бактерии *Formosa algae* КММ 3553Т (коллекция микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН, Владивосток, Россия) в 0,015 М Трис-HCl буфере, pH 7,2 с добавлением 5 мМ CaCl₂ и инкубировали при 34 °С в течение 72 ч. Высокомолекулярные продукты гидролиза осаждали этанолом (1:3, v/v). Выпавший осадок центрифугировали на центрифуге 5804 R (Eppendorf, Германия) при 10000 g в течение 40 мин. Супернатант, содержащий низкомолекулярные продукты реакции, удаляли. Осадок, содержащий высокомолекулярные продукты реакции, растворяли в воде, концентрировали на роторном испарителе Hei-VAP (Heidolph, Германия), высушивали с помощью лиофильной сушилки Иней 4 (Институт биологического приборостроения РАН, Россия) и анализировали с применением ЯМР-спектроскопии. ¹H, ¹³C-ЯМР и 2D ЯМР (COSY, TOCSY, HMBC, HSQC) спектры для растворов фукоиданов в D₂O были получены на ЯМР-спектрометрах Avance III-700 HD (Bruker BioSpin AG, Швейцария) и Avance II-500 HD (Bruker, Германия) с рабочей частотой 700 и 500 МГц при температуре 37 °С.

Содержание общих сахаров в образцах фукоиданов определяли фенол-сернокислотным методом [4]. Концентрацию общих сахаров рассчитывали по соответствующим калибровочным кривым, используя как стандарт L-фукозу (Sigma-Aldrich, Германия). Содержание сульфатных групп в полисахаридах оценивали с помощью турбидиметрического метода [5]. Моносахаридный состав продуктов кислотного гидролиза определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-20A (Shimadzu, Япония) с использованием колонки Shim-pack ISA-07/S2504, 0,4×25 см (Shimadzu, Япония) при 60 °С. Обнаружение проводили бицинхонинатным методом [6]. Моносахариды (L-фукозу (L-Fuc), D-галактозу (D-Gal), D-ксилозу (D-Xyl), D-маннозу (D-Man), D-глюкозу (D-Glc) и ламинарибиозу (Sigma-Aldrich, Германия) использовали в качестве стандартов.

По результатам анализа данных ЯМР-спектроскопии образец 1 представляет собой регулярный полисахарид с повторяющимся дисахаридным звеном [$\rightarrow 3$]- α -L-Fucp(2,4-SO₃⁻)-(1 \rightarrow 4)- α -L-Fucp(2-SO₃⁻)-(1 \rightarrow)_n, сульфатированный преимущественно по C2 и в меньшей мере по C4, ацетильные группы находятся в положении C4 [2]. Нативный фукоидан состоит из 1 \rightarrow 3- и 1 \rightarrow 4-связанных остатков α -L-фукозы и сульфатирован

Таблица 1. Характеристики полисахаридов из бурой водоросли *Fucus evanescens*
Table 1. Characteristics of polysaccharides from the brown alga *Fucus evanescens*

Полисахарид <i>Polysaccharide</i>	Mw, kDa	SO ₃ Na, %	Нейтральные сахара, моль % <i>Neutral sugars, mol %</i>				
			Fuc	Gal	Xyl	Man	Glc
Ферментативно деполимеризованный фукоидан (образец 1) <i>Enzymatically depolymerised fucoidan (sample 1)</i>	50,8	29,7 ^a	97,8	2,2	0	0	0
Нативный фукоидан (образец 2) <i>Native fucoidan (sample 2)</i>	130–430	27,0 ^a	94,1	3,8	2,1	0	0

Примечание. Fuc – L-фукоза, Gal – D-галактоза, Xyl – D-ксилоза, Man – D-манноза, Glc – D-глюкоза.

^a Процент от массы образца.

Note. Fuc–L-fucose, Gal–D-galactose, Xyl–D-xylose, Man–D-mannose, Glc–D-glucose.

^a Percent by weight of the sample.

главным образом по С2 и в меньшей степени по С4, ацетильные группы занимают свободное положение при С4. Нативный фукоидан содержит минорные остатки моносахаридов, такие как галактоза и ксилоза. Молекулярная масса образца 1 составляет 50,8 кДа, для образца 2 – находится в интервале 130–430 кДа (табл. 1) [2, 3].

Экспериментальные исследования образцов фукоиданов *in vitro*

Для исследования фукоиданов *in vitro* использовали образцы венозной крови пяти условно здоровых доноров, стабилизированной гепарином (25 Ед/мл). Фукоиданы вносили в концентрации 100 мкг/мл, овальбумин (ОВА) (EndoFit™ Ovalbumin, InvivoGen Europa, США) – в концентрации 10 мг/мл. В качестве контролей служили: образец фукоидана 2 (контроль 1), ОВА (контроль 2), фосфатный буферный раствор (ФБР) (контроль 3). Культивирование проводили в полной питательной среде (RPMI 1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 ммоль L-глутамин и 20 мг гентамицина) в СО₂-инкубаторе при 37 °С в течение 24 ч.

Уровень экспрессии клеточных маркеров определяли с использованием меченных флуорохромами моноклональных антител к маркерам клеточной дифференцировки (CD) – молекулам CD16, CD25, CD69, CD62L, CD11b, CD56^{bright} и HLA-DR (Beckman Coulter, США) и соответствующих изотипических контролей на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, США). Данные анализировали, используя программное обеспечение BD CellQuest Pro (Becton Dickinson, США). Жизнеспособность клеток оценивали путем окрашивания 7-аминоактиномицином D. Выделение субпопуляций

гранулоцитов (основную часть которых составляют нейтрофилы) осуществляли по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. Моноциты дифференцировали от других клеток по параметрам FSC и SSC, а также по экспрессии клетками молекул CD14. NK-клетки идентифицировали как субпопуляцию лимфоцитов CD3–CD56⁺. Лимфоциты анализировали по параметрам FSC и SSC, а также по экспрессии молекул CD3 для Т-клеток и по экспрессии CD19 или CD20 для В-клеток. В каждой пробе анализировали не менее 1×10⁴ клеток. Результаты измерения представляли в виде среднего количества клеток (в %), экспрессирующих соответствующие маркеры, или показателя средней интенсивности флуоресценции (MFI – mean fluorescence intensity), который косвенно отражает количество молекул, экспрессированных на клеточной мембране.

Экспериментальные исследования образцов фукоиданов *in vivo*

Экспериментальные исследования *in vivo* выполнены на мышах-самцах линии BALB/c массой 18–20 г, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино» и адаптированных в виварии ФГБНУ «Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора. Работу проводили с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях»¹. По окончании эксперимента животных эвтаназируют с использованием эфирного наркоза. Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен

¹ European convention for protection of vertebrate animals used in experimental and other studies. ETS No 123. Strasbourg; 1986.

Этическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 14.03.2019).

Были сформированы 4 группы по 10–12 мышей в каждой для проведения иммунизации: группа 1 – композицией ОВА с ферментативно деполимеризованным фукоиданом (образец 1); группа 2 – ОВА с нативным фукоиданом (образец 2); группа 3 – ОВА с гидроксидом алюминия; группа 4 (контроль) – ОВА с ФБР. ОВА использовали в дозе 100 мкг/мышь, фукоиданы – в дозе 5 мг/мышь. Суспензию ОВА с фукоиданами или с гидроксидом алюминия готовили путем смешивания или адсорбции на геле гидроксида алюминия в течение 1 ч. В качестве растворителя использовали ФБР pH 7,2.

Иммунизацию осуществляли внутрибрюшинно трехкратно с интервалом 2 недели (0, 14, 28 сут). Через 35 сут от начала иммунизации проводили отбор крови из сонных артерий и получали сыворотку, которую хранили при минус 70 °С. В сыворотке крови определяли уровень специфических антител IgG, IgG1 и IgG2a с применением тест-системы (Mouse Anti-OVA IgG, IgG1 and IgG2a Antibody Assay Kit, Chondrex Inc., США) и выражали в десятичных логарифмах концентрации (lg [концентрация], мкг/мл). Уровень цитокинов (IFN- γ , IL-2, IL-10, IL-12) в сыворотке крови мышей определяли с применением тест-систем Mouse Platinum ELISA (eBioscience, Австрия). Результаты измеряли на микропланшетном спектрофотометре Multiscan RC (Labsystems, Финляндия) при 450 нм.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Выборочные параметры, используемые в таблицах, имеют следующие обозначения: медиана (*Me*), минимальное и максимальное значения (*min–max*), объем анализируемой подгруппы (*n*), достигнутый уровень значимости (*p*). Оценку различий в связанных группах проводили с использованием критерия Вилкоксона, между двумя независимыми группами – Манна–Уитни (в экспериментах *in vitro*). Результаты экспериментов *in vivo* представлены в виде среднего арифметического (*M*) \pm стандартное отклонение (δ). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При исследовании влияния фукоиданов на экспрессию клеточных маркеров *in vitro* вы-

явлены существенные изменения (табл. 2). Показано изменение функционального состояния нейтрофилов, что проявлялось в повышении уровня экспрессии молекул активации CD69 и молекул адгезии CD11b, относящихся к семейству β 2-интегринов, и снижении за счет слушивания с клеточной поверхности молекулы CD62L (L-селектин) по сравнению с контролем 3 (ФБР) или по сравнению с клетками, инкубированными с ОВА (контроль 2) ($p < 0,05$).

Активация моноцитов под действием фукоиданов сопровождалась повышением уровня экспрессии молекул ранней (CD69) и поздней (HLA-DR) активации по сравнению с контролем 3 (ФБР) ($p < 0,05$). Наиболее выраженные изменения функционального состояния нейтрофилов и моноцитов регистрировались при совместном культивировании образца 1 с ОВА по сравнению с контролем 3 (ФБР) или по сравнению с контролем 2 (ОВА) ($p < 0,05$) (табл. 2).

В популяции NK-клеток под влиянием фукоиданов усиливалась экспрессия молекул CD16 по сравнению с контролем 3 (ФБР) и CD56^{bright} по сравнению с контролями 2 и 3 (ФБР и ОВА) ($p < 0,05$). Под влиянием образцов фукоидана повышался уровень экспрессии молекул HLA-DR по сравнению с контролем 3 (ФБР) ($p < 0,05$), что свидетельствует об активации и повышении цитотоксического потенциала NK-клеток, являющихся основным компонентом системы врожденного иммунитета и играющих важную роль в элиминации клеток, инфицированных вирусами, а также опухолевых клеток [7, 8].

При инкубировании образцов крови с фукоиданами или с комбинацией ферментативно деполимеризованного фукоидана (образец 1) с ОВА в популяции Т-лимфоцитов повышалась экспрессия маркеров активации (CD69, CD25, HLA-DR) по сравнению с контролем 3 (ФБР) ($p < 0,05$), в то время как по отношению к контролю 2 (ОВА) различия касались лишь отдельных показателей. Аналогичная тенденция наблюдалась и в отношении экспрессии маркеров CD69 и CD25 В-клетками (табл. 2).

Таким образом, активирующий эффект ОВА на исследуемые популяции клеток проявлялся незначительно, тогда как при его совместном инкубировании с фукоиданом степень активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета усиливалась в значительной мере. При этом эффекты нативного фукоидана (образец 2) на экспрессию маркеров активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета были сопоставимы с эффектами ферментативно деполимеризованного фукоидана (образец 1).

Таблица 2. Влияние образцов фукоидана на экспрессию маркеров активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета
Table 2. Effects of fucoidan samples on activation marker expression by innate and adaptive immunity cells

Субпопуляция клеток <i>Cell subpopulation</i>	Маркер активации (единицы измерения) <i>Activation marker (measurement units)</i>	Фукоидан, образец 1 <i>Fucoidan, sample 1</i>	Фукоидан, образец 1 + ОВА <i>Fucoidan, sample 1 + OVA</i>	Контроль <i>Control</i>		
				Фукоидан, образец 2 (контроль 1) <i>Fucoidan, sample 2 (control 1)</i>	ОВА (контроль 2) <i>OVA (control 2)</i>	ФБР (контроль 3) <i>PBS (control 3)</i>
Нейтрофилы <i>Neutrophils</i>	CD69 (MFI)	26,8** (19–36)	39,6** (18–63)	33,2** (14–54)	14,7 (8–22)	10,3 (4–17)
	CD62L (MFI)	11,5** (8–17)	12,4** (7–19)	13,8** (8–21)	43,1 (27–60)	39,0 (22–8)
	CD11b (MFI)	2621** (1738–3670)	2819** (2332–3934)	2706** (1839–3631)	1959* (1298–2653)	1023 (802–1264)
Моноциты <i>Monocytes</i>	CD69 (MFI)	454,1** (230–680)	624,1** (311–938)	555,4** (243–869)	40,9* (19–61)	28,7 (9–49)
	CD62L (MFI)	7,4** (5–11)	9,6** (5–16)	10,9** (4–17)	28,6 (12–46)	27,8 (11–45)
	HLA-DR (MFI)	161* (112–206)	208* (134–295)	194* (129–278)	158* (98–199)	91 (64–121)
NK-клетки <i>NK cells</i>	CD16 (MFI)	56,9* (34–82)	68,4* (42–96)	47,6* (23–73)	46,9* (28–66)	37,5 (25–51)
	CD56 ^{bright} (%)	8,4** (4–13)	14,9** (10–19)	13,0** (6–21)	4,7 (2–9)	5,9 (3–10)
	HLA-DR (%)	4,7^ (3,0–6,4)	9,2** (5,1–14,2)	8,4** (6,2–10,5)	4,4 (2,8–6,9)	4,2 (2,1–6,7)
Т-лимфоциты (CD3 ⁺) <i>T-cells (CD3⁺)</i>	CD69 (%)	31,4** (19–45)	36,2** (16–59)	26,9** (13–41)	14,1 (9–19)	3,2 (1–5)
	CD25 (%)	9,1* (6,2–14,1)	15,1** (9,2–20,8)	6,4 (4,1–8,8)	7,8 (4,4–11,8)	5,9 (3,7–7,9)
	HLA-DR (%)	6,4* (4,2–8,9)	8,9** (3,3–14,3)	5,4 (3,2–9,0)	4,9 (3,4–8,1)	4,1 (2,1–6,9)
В-лимфоциты (CD20 ⁺) <i>B-cells (CD20⁺)</i>	CD69 (%)	25,1* (18,5–28,4)	34,4** (21,9–44,4)	28,7** (16,4–32,6)	14,5 (7,2–21,1)	11,3 (6,2–14,2)
	CD25 (%)	6,6* (4,9–9,5)	10,2* (6,1–13,8)	5,8* (3,3–8,2)	6,9* (4,4–9,1)	2,3 (1,2–3,5)

Примечание. ОВА – овалбумин, ФБР – фосфатный буферный раствор, MFI – среднее значение интенсивности флуоресценции. Значения представлены в виде показателя медианы *Me* и в скобках – min–max (*n*=5). * *p*<0,05 – значимость различий показателей по отношению к контролю 3 (ФБР); # *p*<0,05 – значимость различий показателей по отношению к контролю 2 (ОВА), ^ *p*<0,05 – значимость различий показателей образца фукоидана 1 по сравнению с образцом фукоидана 2.

Note. OVA – ovalbumin, MFI – mean fluorescence intensity. The table presents median (*Me*) values with min–max ranges in brackets (*n*=5). * – compared to control 3 (PBS), *p*<0.05; # – compared to control 2 (OVA), *p*<0.05; ^ – Fucoidan sample 1 compared to Fucoidan sample 2, *p*<0.05.

Описанную выше модель с применением совместного воздействия ОВА с фукоиданом на иммунные клетки или в условиях антигенной нагрузки клеток можно рассматривать в качестве модели вакцинной композиции *in vitro*.

Анализ специфического иммунного ответа *in vivo* показал, что иммунизация мышей ОВА (группа 4) приводила к незначительному повышению уровня общих IgG, тогда как под влиянием образца 1 (группа 1) содержание общего IgG увеличивалось с 1,43±0,22 до 2,48±0,41 lg

[мкг/мл] (*p*<0,05), а под влиянием образца 2 – до 2,23±0,43 lg [мкг/мл] (*p*<0,01) по сравнению с контролем (группа 4). Исследуемые образцы фукоиданов также усиливали продукцию изотипов антител IgG1 и IgG2a (*p*<0,05) (рис. 1).

Для уточнения преимущественного типа иммунного ответа рассчитывали соотношение изотипов антител IgG1/IgG2a (мкг/мл), которое составило 2,8 для каждого из испытуемых образцов. Для гидроксида алюминия этот показатель составил 23,1, что свидетельствует

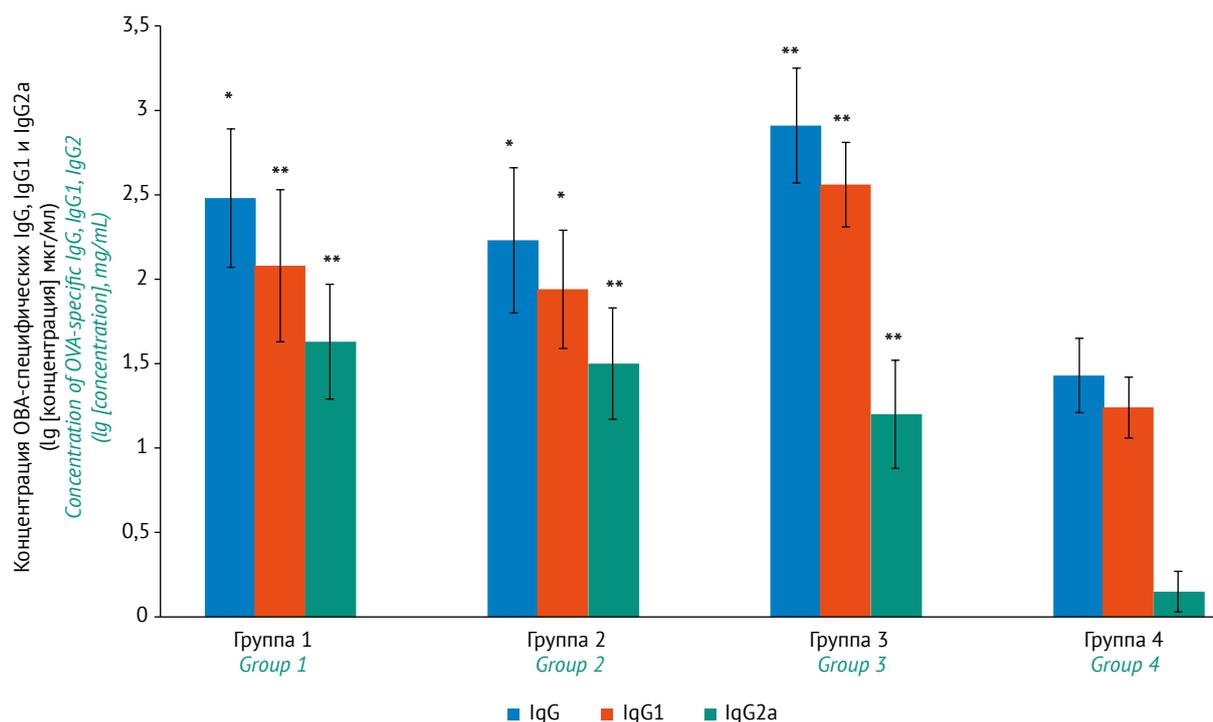


Рис. 1. Уровень овальбумин (OVA)-специфических IgG, IgG1 и IgG2a в сыворотке крови мышей после иммунизации. По оси абсцисс – группы иммунизированных животных: Группа 1 – ферментативно деполимеризованный фукоидан (образец 1) + OVA; Группа 2 – нативный фукоидан (образец 2) + OVA; Группа 3 – гидроксид алюминия + OVA; Группа 4 – OVA (контроль). В легенде представлены изоотипы антител. Данные гистограмм представлены в виде показателя $M \pm \delta$ ($n=6$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – различия значимы по отношению к контролю (OVA).

Fig. 1. Serum levels of ovalbumin (OVA)-specific IgG, IgG1, and IgG2a in immunised mice. The X-axis lists the groups of immunised animals: Group 1—enzymatically depolymerised fucoidan (sample 1) + OVA; Group 2—native fucoidan (sample 2) + OVA; Group 3—aluminum hydroxide + OVA; Group 4—OVA (control). The legend specifies antibody isotypes. Bars show data as $M \pm \delta$ ($n=6$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ —compared to the control (OVA).

о преимущественном развитии иммунного ответа по Th2-типу.

В сыворотке крови мышей, иммунизированных композициями OVA с обоими образцами фукоиданов (группа 1 и группа 2) наблюдалось усиление продукции $IFN-\gamma$ ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (группа 4), тогда как применение гидроксида алюминия в качестве адьюванта (группа 3) не оказывало влияния на уровень $IFN-\gamma$ ($p > 0,05$). Уровень IL-2 под влиянием образцов фукоидана 1 и 2 значительно отличался от показателей в контроле (OVA) ($p < 0,05$), под влиянием гидроксида алюминия эти различия не были значимы ($p > 0,05$). Такая же тенденция выявлена в отношении регуляторного цитокина IL-12. В отношении IL-10 стимулирующее влияние образца 1 носило характер тенденции, а под влиянием образца 2 и гидроксида алюминия выявлено усиление продукции IL-10 по сравнению с контролем (группа 4) ($p < 0,05$) (рис. 2).

В последние годы в результате активного изучения сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей (фукоиданов) и других природных и синтетических соединений

полисахаридной природы выявлены их иммуноадьювантные свойства [9–13]. Несмотря на высокую биологическую активность и низкую токсичность, фукоиданы до сих пор не применяются в качестве фармацевтических субстанций. Однако широкие исследования, направленные на получение стандартизованных препаратов и на изучение терапевтического и иммуноадьювантного потенциала фукоиданов, продолжают.

В данной работе проведено исследование иммуноадьювантных свойств ферментативно деполимеризованного фукоидана в сравнении с нативным фукоиданом, который, в отличие от нативного, характеризуется регулярной воспроизводимой структурой. Проведенное исследование показало, что применение модифицированного фукоидана способствовало повышению уровня активации клеток врожденного и адаптивного иммунитета в условиях антигенной нагрузки и стимулировало развитие специфического гуморального иммунного ответа у мышей, иммунизированных OVA, усиливая уровень продукции как общих IgG, так и изооти-

пов IgG1 и IgG2a, а также продукцию цитокинов Th1-типа (IFN- γ , IL-2) и Th2-типа (IL-10).

Иммунный ответ на антигены различной природы реализуется в реакциях клеточного и гуморального иммунитета. С развитием клеточного иммунитета коррелирует Th1-иммунный ответ, выражающийся продукцией цитокинов TNF- β , IFN- γ , IL-2 и усиленной выработкой IgG2a, IgG2b, IgG3 у мышей [14], а с развитием гуморального иммунитета – Th2-иммунный ответ, который характеризуется продукцией преимущественно противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10, IL-3, IL-5 и IgG1 [15–17]. Адьюванты в составе вакцинных препаратов определяют поляризацию иммунного ответа по Th1- или Th2-типу в зависимости от природы антигена [15]. Как известно, адьюванты на основе гидроксида алюминия инициируют поляризацию иммунного ответа в сторону Th2-типа, отвечающего за выработку антител [18], что и следует из полученных нами результатов. Учитывая тот факт, что при вирусных и многих микробных инфекциях более эффективным является иммунный ответ по Th1-типу, существует потребность в разработке новых

эффективных и безопасных адьювантов, отвечающих этим требованиям.

Полученные в работе результаты продемонстрировали, что под влиянием обоих образцов фукоиданов из *F. evanescens* у иммунизированных OVA мышей линии BALB/c наблюдалось значительное увеличение титров всего спектра исследуемых антител (IgG, IgG1, IgG2a), а также усиление продукции цитокинов Th1-типа (IFN- γ , IL-2) и Th2-типа (IL-10). Таким образом, исследованные образцы фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* обладают значительным адьювантным потенциалом для усиления как клеточного, так и гуморального иммунного ответа.

Заключение

Исследованные образцы фукоидана (нативного и ферментативно деполимеризованного) из бурой водоросли *F. evanescens* обладают иммуоадьювантной активностью, стимулируя формирование смешанного Th1/Th2 иммунного ответа в условиях иммунизации антигеном (овальбумин). Адьювантное действие связано с усилением продукции цитокинов,

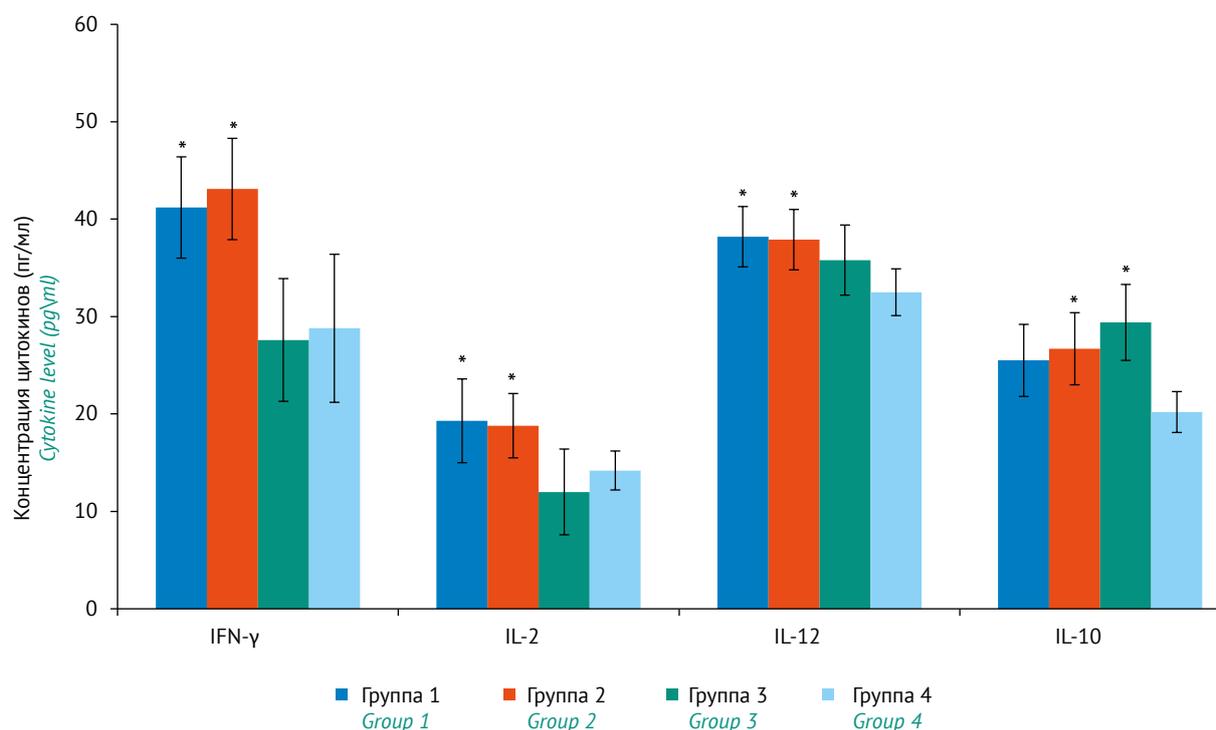


Рис. 2. Влияние образцов фукоидана на продукцию цитокинов в сыворотке крови иммунизированных мышей. По оси абсцисс – наименование цитокина. В легенде указаны группы иммунизированных животных: Группа 1 – ферментативно деполимеризованный фукоидан (образец 1) + овальбумин (OVA); Группа 2 – нативный фукоидан (образец 2) + OVA; Группа 3 – гидроксид алюминия + OVA; Группа 4 – OVA (контроль). Данные гистограмм представлены в виде показателя $M \pm \delta$ ($n=6$). * $p < 0,05$ – значимость различий показателей в сравнении с контролем (OVA).

Fig. 2. Effects of fucoidan samples on serum cytokine production in immunised mice. The X-axis specifies the cytokines. The legend lists the groups of immunised animals: Group 1—enzymatically depolymerised fucoidan (sample 1) + OVA; Group 2—native fucoidan (sample 2) + OVA; Group 3—aluminum hydroxide + OVA; Group 4—OVA (control). Bars show data as $M \pm \delta$ ($n=6$). * $p < 0.05$ —compared to the control (OVA).

активацией клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета, что свидетельствует об усилении эффекторных функций. Активирующее влияние ферментативно деполимеризованного производного фукоидана с регулярной структурой на эффекторные функции клеток врожденного и адаптивного иммунитета не уступает таковому у нативного

образца фукоидана. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что структурно охарактеризованный модифицированный фукоидан, полученный путем ферментативного гидролиза, может являться эффективным и безопасным кандидатом в адъюванты для широкого спектра профилактических и терапевтических вакцин.

Литература/References

1. Menshova RV, Shevchenko NM, Imbs TI, Zvyagintseva TN, Malyarenko OS, Zaporoshets TS, et al. Fucoidans from Brown Alga *Fucus evanescens*: structure and biological activity. *Front Marine Sci.* 2016;3:1–9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00129>
2. Silchenko AS, Rasin AB, Kusaykin MI, Malyarenko OS, Shevchenko NM, Zueva AO, et al. Modification of native fucoidan from *Fucus evanescens* by recombinant fucoidanase from marine bacteria *Formosa algae*. *Carbohydr Polym.* 2018;193:189–95. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.094>
3. Anastyuk SD, Shevchenko NM, Dmitrenok PS, Zvyagintseva TN. Structural similarities of fucoidans from brown algae *Silvetia babingtonii* and *Fucus evanescens*, determined by tandem MALDI-TOF mass spectrometry. *Carbohydr Res.* 2012;358:78–81. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.06.015>
4. Dubois M, Gilles K, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. A colorimetric method for the determination of sugars. *Nature.* 1951;168(4265):167. <https://doi.org/10.1038/168167a0>
5. Dodgson KS, Price RG. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem J.* 1962;84(1):106–10. <https://doi.org/10.1042/bj0840106>
6. Waffenschmidt S, Jaenicke L. Assay of reducing sugars in nanomole range with 2,2-bicinchoninate. *Anal Biochem.* 1987;165(2):337–40. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90278-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90278-8)
7. Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood.* 2013;121(18):3599–608. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-425397>
8. Ahmad F, Tufa DM, Mishra N, Jacobs R, Schmidt RE. Terminal differentiation of CD56(dim)CD16(+) natural killer cells is associated with increase in natural killer cell frequencies after antiretroviral treatment in HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2015;31(12):1206–12. <https://doi.org/10.1089/aid.2015.0115>
9. Kuznetsova TA, Persiyanova EV, Ermakova SP, Khotimchenko MYu, Besednova NN. The sulfated polysaccharides of Brown Algae and products of their enzymatic transformation as potential vaccine adjuvants. *Nat Prod Com.* 2018;13(8):1083–95. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300837>
10. Zhang W, Oda T, Yu Q, Jin JO. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Mar Drugs.* 2015;13(3):1084–104. <https://doi.org/10.3390/md13031084>
11. Kim SY, Joo HG. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J Vet Sci.* 2015;16(2):145–50. <https://doi.org/10.4142/jvs.2015.16.2.145>
12. Ikewaki N, Dedeepiya VD, Raghavan K, Rao KS, Vaddi S, Osawa H, et al. β -glucan vaccine adjuvant approach for cancer treatment through immune enhancement (B-VACCIEN) in specific immunocompromised populations (Review). *Oncol Rep.* 2022;47(1):14. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8225>
13. Pifferi C, Fuentes R, Fernández-Tejada A. Natural and synthetic carbohydrate-based vaccine adjuvants and their mechanisms of action. *Nat Rev Chem.* 2021;5(3):197–216. <https://doi.org/10.1038/s41570-020-00244-3>
14. Seder RA, Hill AV. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature.* 2000;406(6797):793–8. <https://doi.org/10.1038/35021239>
15. McKee AS, Munks MW, Marrack P. How do adjuvants work? Important considerations for new generation adjuvants. *Immunity.* 2007;27(5):687–90. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.003>
16. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.* 2010;33(4):492–503. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002>
17. Mathers AR, Cuff CF. Role of interleukin-4 (IL-4) and IL-10 in serum immunoglobulin G antibody responses following mucosal or systemic reovirus infection. *J Virol.* 2004;78(7):3352–60. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.7.3352-3360.2004>
18. Gherardi RK, Eidi H, Crépeaux G, Authier FJ, Cadusseau J. Biopersistence and brain translocation of aluminum adjuvants of vaccines. *Front Neural.* 2015;6:4. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00004>

Вклад авторов. Т.А. Кузнецова — планирование и проведение экспериментов *in vitro* и *in vivo*, интерпретация результатов, написание и оформление текста рукописи; Т.П. Смолина — проведение цитометрических исследований и интерпретация результатов; Е.В. Персиянова — проведение экспериментов *in vivo*;

Authors' contribution. Т.А. Kuznetsova—planning and execution of *in vitro* and *in vivo* experiments, interpretation of the results, writing and formatting of the text of the manuscript; Т.П. Smolina—performance of cytometric analyses and interpretation of the results; Е.В. Persiyanova—execution of *in vivo* experiments; Л.А. Ivanushko—

Л.А. Иванушко – проведение экспериментов *in vivo*; **А.С. Сильченко** – выделение и анализ образцов фукоидана; **С.П. Ермакова** – выделение и анализ образцов фукоидана; **Н.Н. Беседнова** – интерпретация результатов, редактирование текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Протокол исследования с использованием лабораторных животных был одобрен этическим комитетом «Научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 14.03.2019).

Благодарности. Работа выполнена в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» Роспотребнадзора в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации 2019/№ 0545-2019-0006.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

execution of *in vivo* experiments; **A.S. Silchenko**—isolation and analysis of fucoidan samples; **S.P. Ermakova**—isolation and analysis of fucoidan samples; **N.N. Besednova**—interpretation of the results, editing of the text of the manuscript.

Ethics approval. The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology (Protocol No. 1 dated 14.03.2019).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out by G.P. Somov Institute of Epidemiology and Microbiology as part of publicly funded research project 2019/No. 0545-2019-0006 of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Кузнецова Татьяна Алексеевна, д-р мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-6959>
takuznets@mail.ru

Смолина Татьяна Павловна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4505-3627>
tsmol@mail.ru

Персиянова Елена Викторовна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5686-8672>
helen-pers@yandex.ru

Иванушко Людмила Александровна, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9525-668X>
L.iva_57@mail.ru

Сильченко Артем Сергеевич, канд. хим. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3502-5692>
artem.silchencko@yandex.ru

Ермакова Светлана Павловна, д-р хим наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5905-2046>
swetlana_e@mail.ru

Беседнова Наталия Николаевна, д-р мед. наук, проф., акад. РАН. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2760-9778>
besednoff_lev@mail.ru

Tatyana A. Kuznetsova, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-6959>
takuznets@mail.ru

Tatyana P. Smolina, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4505-3627>
tsmol@mail.ru

Elena V. Persiyanova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5686-8672>
helen-pers@yandex.ru

Ludmila A. Ivanushko, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9525-668X>
L.iva_57@mail.ru

Artem S. Silchenko, Cand. Sci. (Chem.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3502-5692>
artem.silchencko@yandex.ru

Svetlana P. Ermakova, Dr. Sci. (Chem.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5905-2046>
swetlana_e@mail.ru

Natalya N. Besednova, Dr. Sci. (Med.), Professor, Acad. of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2760-9778>
besednoff_lev@mail.ru

Поступила 29.03.2022

После доработки 18.08.2022

Принята к публикации 26.08.2022

Received 29 March 2022

Revised 18 August 2022

Accepted 26 August 2022