

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
Научно-исследовательский институт микробиологии и эпидемиологии СО РАМН
Медобъединение ДВО РАН

Анастюк С.Д., Беседнова Н.Н., Богданович Л.Н., Ермакова С.П., Запорожец Т.С., Звягинцева Т.Н., Имбс Т.И., Ковалев Н.Н., Крупнова Т.Н., Кузнецова Т.А., Кусайкин М.И., Крыжановский С.П., Макаренкова И.Д., Пивненко Т.Н., Сомова Л.М., Шевченко Н.М.

Фукоиданы – сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура и биологические свойства

СОДЕРЖАНИЕ

Глава 1. Крупнова Т.Н. Биология, распространение, культивирование и воспроизводство бурых водорослей.....	10
Глава 2. Кусайкин М.И., Звягинцева Т.Н. Фукоиданы и ферменты, катализирующие их превращения.....	35
Глава 3. Анастюк С.Д., Звягинцева Т.Н. Исследование структурных особенностей фукоиданов методом масс-спектрометрии.....	60
Глава 4. Имбс Т.И., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н. Проблемы стандартизации препаратов полисахаридов бурых водорослей.....	95
Глава 5. Имбс Т.И., Шевченко Н.М. Технологии переработки бурых водорослей.....	110
Глава 6. Кузнецова Т.А. Антикоагулянтная и фибринолитическая активность сульфатированных полисахаридов.....	133
Глава 7. Крыжановский С.П., Богданович Л.Н., Кушнерова Н.Ф. Коррекция атерогенных дислипидемий полисахаридами морских водорослей.....	148
Глава 8. Макаренкова И.Д., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Сульфатированные полисахариды бурых водорослей – агонисты функций врождённого иммунитета.....	187
Глава 9. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Действие сульфатированных полисахаридов водорослей на факторы адаптивного иммунитета и продукцию цитокинов.....	217
Глава 10. Беседнова Н.Н. Противовоспалительные эффекты сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей.....	229

Глава 11. Беседнова Н.Н., Макаренко И.Д.
**Антиинфекционные свойства
сульфатированных полисахаридов**.....244

Глава 12. Кузнецова Т.А., Сомова Л.М.
**Применение сульфатированных полисахаридов для коррекции
нарушений при эндотоксинемии**.....277

Глава 13. Запорожец Т.С., Ермакова С.П., Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н.
**Противоопухолевое действие сульфатированных
полисахаридов из морских бурых водорослей**.....294

Литература.....311

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ATL (adult T-cell leukemia/lymphoma) — Т-клеточная лейкемия
Bcl-2 — антиапоптотический белок
Bcl-xL — антиапоптотический белок
Beclin-1 — белок, активатор аутофагии
C1q — компонент комплемента
C2, 3, 4 — белки системы комплемента
CD (cell differentiation antigen или cluster differentiation) — антигены кластеров дифференцировки клеток
COX — циклооксигеназа
CR (complement component receptor) — рецепторы комплемента
СПЭВ — перевиваемая линия эпителиальных клеток почек эмбрионов свиней
DEAE (diethylaminoethyl) — диэтиламиноэтил
DR5 (Death Receptor) — рецептор смерти
ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) — внеклеточная сигнал-регулирующая киназа
F — фукоидан
Fas — трансмембранный белок, рецептор, тирозинкиназа
FcR — рецептор для Fc-фрагмента молекулы иммуноглобулина
Fuc (Fucose) — фукоза
G1 и G2 — гликопротеины хантавируса
Gal (Galactose) — галактоза
G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
Glc (Glucose) — глюкоза
GlcA (Glucuronic acid) — глюкуроновая кислота
GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
НАМ/TSP (myelopathy/tropical spastic paraparesis) — миелопатия/тропический спастический паразез
НС II (heparine cofactor II) — гепариновый кофактор II
НЕК — линия клеток эмбрионального почечного эпителия человека
НepG2 — культура клеток печени человека
HIV (Human immunodeficiency virus) — вирус иммунодефицита человека
HLA (human leucocyte antigens) — антигены тканевой совместимости человека
HSL — гормончувствительной липазы
HSV-1 и HSV-2 (Herpes simplex virus-1 и -2) — вирусы простого герпеса

са 1 и 2 типов
HTLV (human T-lymphotropic virus) — лимфотропный ретровирус человека
HTLV-1 — Т-лимфотропный вирус человека
IAP — антиапоптотический белок
IFN (interferon) — интерферон
Ig (immunoglobulin) — иммуноглобулины
IL — interleukin — интерлейкин
iNOS (NADPH-оксидаза или NOX) индуцибельная нитрооксидсинтаза
IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinase) — киназа, ассоциированная с рецептором для интерлейкина-1
JNK (c-Jun N-terminal kinases) — терминальная протеинкиназа
L — ламинаран
LC3 — микротубулин-связанный белок легкой цепи 3
LD100 — абсолютная летальная доза
lg — логарифм
Man (Mannose) — манноза
MAP — митоген-активируемая протеинкиназа
Mcl-1 — антиапоптотический белок
MDCK — перевиваемая культура клеток почки собаки
MEKK1 — митоген-активируемая протеинкиназа киназы 1
mRNA (messenger ribonucleic acid) — матричная рибонуклеиновая кислота
MyD88 (myeloid differentiation primary response gene) — белок первичного ответа миелоидной дифференцировки
NK — (natural killer cells) нормальные клетки
NO — оксид азота
NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) — нуклеотидсвязывающий олигомеризующийся домен
NRP1 — нейрофилин-мембранно-связанная изоформа рецептора, участвующего в ангиогенезе
p38 — митогенактивируемая протинкиназа (белок семейства MAP киназ)
PAMPs (patogen associated molecular patterns) — патоген-ассоциированные молекулярные структуры
PRR (pattern recognition receptors) — образ распознающие рецепторы
RAW264.7 — культура мышинных макрофагов
Rha (Rhamnose) — рамноза
SAPK/JNK — (c-Jun N-terminal kinase/Stress activated protein kinase) семейства протеинкиназ
SR-A (class A macrophage scavenger receptor) — макрофагальный ска-

венджер-рецептор
STAT — преобразователи сигнала и активаторов транскрипции
TF (tissue factor) — тканевой фактор
Th (T-helper-1 и 2) — субпопуляции CD4+ Т-лимфоцитов (хелперов),
Th1, 2 — T-helper-1, 2 — субпопуляции CD4+ Т-лимфоцитов (хелперов)
TIRAP (MAL) (TIR domain containing adaptor protein) — адаптерный белок, содержащий NF-κB (nuclear factor-κB) — транскрипционный ядерный фактор
TLR (Toll like receptors) — Toll-подобные рецепторы
TNFα (tumor necrosis factor) — фактор некроза опухоли альфа
TRAIL — TNF-зависимый лиганд, индуцирующий апоптоз
TRAM (TIR domain-containing adapter inducing IFN-β) — адаптерный белок, содержащий TIR домен
TRIF (related adapter molecule, toll-interleukin 1 receptor - TIR domain) — адаптерный белок, содержащий TIR домен
VEGFR — рецептор фактора роста эндотелия сосудов
Vero E6 — перевиваемая линия клеток почки африканской зеленой марышки
Xyl (Xylose) — ксилоза
aIIa — активность против фактора свертывания крови IIa
АПК — антигенпредставляющие клетки
апо А — (апопротеин)
апо А ЛПВП — аполипопротеины А
апо В — (апопротеин ЛПНП)
апо В ЛПВП — аполипопротеины В
АПТВ — активированное парциальное тромбопластиновое время
АТ III — антитромбин III
аХа — активность против фактора свертывания крови Ха
БАВ — биологически активные вещества
БВ — бурые водоросли
БТ — базисная терапия
ВИЧ — вирус иммунодефицита человека
В-клетки — В лимфоциты
ВТМ — вирус табачной мозаики
ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография
ГБ — гипертоническая болезнь
ГЖХ — газо-жидкостная хроматография
ГЖХ-МС — хромато-масс-спектрометрия
ГЛПС — геморрагическая лихорадка с почечным синдромом
ГМГ-КоА-редуктаза — 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктаза

ДВС — синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови
ДК — дендритные клетки
ДМСО — диметилсульфоксид
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
ДФГ — дифосфатидилглицерин
ИК — инфракрасная спектроскопия
ИЭР — ионизация электрораспылением
КА — коэффициент атерогенности
КЭ — клещевой энцефалит
ЛП — липопротеин
ЛПЛ — липопротеинлипаза
ЛПС — липополисахарид
ЛФХ — лизофосфатидилхолин
ЛФЭ — лизофосфатидилэтаноламин
ЛХАТ — лецитин-холестерин-ацилтрансфераза
МАЛДИ — матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
ММР — металлопротеиназы
ММР-9 — матриксная металлопротеиназа 9
МНС (major histocompatibility complex) — главный комплекс гистосовместимости
МС — масс-спектрометрия
Мф — макрофаги
НАДФ-Н (NADPH-оксидаза или NOX) — клеточный мембрано-связанный мультимолекулярный ферментный комплекс
НМГ — низкомолекулярный гепарин
НСТ — тест восстановления нитросинего тетразолия
Нф — нейтрофилы
НФГ — нефракционированный гепарин
ОЕ — оптические единицы
ОХС — общий холестерин
ПВ — протромбиновое время
ПГЕ — простагландины группы Е
ПОН — полиорганная недостаточность
ПТИ — протромбиновый индекс
РНК — рибонуклеиновая кислота
СХСР — рецептор СХС-хемокинов (α -хемокинов)
СКК — среднее количество светящихся клеток
СМ — сфингомиелин
СПЖ — средняя продолжительность жизни

СПС — сульфатированные полисахариды
ССР — рецептор СС-хемокинов (β -хемокинов)
ТВ — тромбиновое время
ТГ — триглицериды
ТСХ — тонкослойная хроматография
ТФУ — трифторуксусная кислота
ТЦИД50 (tissue culture infecting dose, 50%) — инфекционная доза в тканевой культуре
УСПЖ — увеличение средней продолжительности жизни
ФА — фибринолитическая активность
ФГ — фибриноген
ФИ — фосфатидилинозит
ФС — фосфатидилсерин
ФФЕ — фокус формирующие единицы
ФХ — фосфатидилхолин
ФЭ — фосфатидилэтаноламин
ХС-ЛПВП — холестерин липопротеинов высокой плотности
ХС-ЛПНП — холестерин липопротеинов низкой плотности
ХС-ЛПОНП — холестерин липопротеинов очень низкой плотности
ЭЖК — эфиры жирных кислот
ЭХС — эфиры холестерина
ЯМР — ядерный магнитный резонанс

Глава 1. Биология, распространение, культивирование и воспроизводство бурых водорослей

Мир водорослей огромен, уникален и разнообразен. За миллионы лет существования нашей планеты водоросли - макрофиты приобрели совершенные морфологические и физиологические формы и приспособились к изменяющимся условиям среды, что привело к широкому их распространению и разноплановым биотическим взаимоотношениям с другими видами. Водоросли выработали комплекс уникальных целебных свойств, которыми часто не обладают растения, живущие на суше.

Водорослевые поля и морские плантации с культивируемыми растениями являются своеобразными гигантскими рифами, имеющими высокую биологическую продуктивность, которая создается за счет реализации следующих функций:

— поля водорослей являются гасителями энергии морских волн, сдерживая их разрушительное воздействие на береговую полосу во время штормов. Это обеспечивает замедление водообмена водной массы внутри водорослевого пояса с открытой частью побережья, что способствует накоплению на плантациях автотрофного компонента биоценоза и биогенных элементов, а также пелагических личинок гидробионтов.

Водоросли — это дополнительный субстрат, дефицит которого постоянно ощущается в море, на который оседает икра и личинки гидробионтов;

— убежище от врагов для молоди многих животных;

— высокопродуктивные пастбища — в ризоидах водорослей и между пластинами создается благоприятный гидрологический и гидрохимический режим, способствующий развитию микроводорослей, накоплению детрита и образованию микробиальной пленки; здесь поселяются морские козочки, асцидии, мшанки, полихеты — кормовые объекты для питания многих видов рыб и беспозвоночных. Сами водоросли также служат кормом в виде их слоевищ для морских ежей или в виде выделяемого ими органического вещества для гребешка и других фильтраторов.

Водоросли — это биологические фильтры для очистки загрязненных вод побережья у больших городов. Популяции макрофитов в местах слива сточных вод достигают наиболее полного развития как результат улучшенного питания за счет дополнительных источников азота и фосфора. Плантация ламинарии площадью в один гектар способна за сутки извлечь из воды около 250 кг азота.

Морские водоросли продуцируют значительную долю мирового кислорода, роль которого трудно переоценить для всего живого. Широко

известно, что 80% кислорода выделяется морскими водорослями — макрофитами и микроводорослями и только 20% — наземными растениями. Поэтому мировой океан принято называть «легкими планеты».

Роль водорослей в сфере использования их биомассы для нужд человечества огромна. В современном мире особенно в развитых странах общество все большее внимание уделяет проблемам долголетия и здоровья, которые напрямую связывают с качеством питания. При этом упор делается на потребление полезной пищи с включением водорослей и продуктов их переработки, а также на лекарственные и лечебно-профилактические препараты из водорослей. Употребление человеком в пищу водорослей и продуктов из них способствует выведению из организма радионуклидов, токсичных веществ, тяжелых металлов; регулирует свертываемость крови, снижает уровень холестерина в крови и риск развития атеросклероза и других сердечно-сосудистых заболеваний, улучшает работу желудочно-кишечного тракта, предотвращает развитие раковых клеток и укрепляет иммунитет. Морские водоросли — лучшее средство лечения и профилактики йододефицита и связанных с ним заболеваний щитовидной железы. Бурые и красные водоросли являются источником природных гидроколлоидов - альгината, агара, каррагинана и целого ряда биологически активных веществ, используемых в пищевой, медицинской, фармацевтической и других отраслях промышленности. Общие объемы мирового производства гидроколлоидов составляют: альгинатов — 40, агара — 6—6,5; каррагинана — 30 тыс.т в год (Подкорытова, 2002).

В последнее время значительно возрос интерес к производству из водорослей таких ценных полисахаридов как ламинаран и фукоидан. Ламинаран является исходным веществом для получения лекарственных препаратов, повышающих устойчивость иммунной системы, имеющих противоопухолевую направленность. Фукоиданы — сульфатированные полисахариды, привлекающие внимание ученых из-за их антираковых, антитромбических, антикоагулянтных и антивирусных свойств (Kloareg, 1988; Усов, 1989; Zvyagintseva, 2003; Киселева, 2005).

Способность полисахаридов водорослей образовывать комплексные соединения с солями тяжелых металлов и радионуклидов используется при получении препаратов для очищения организмов от этих токсинов (Bertheau, 2003).

Ламинаран и фукоидан в слоевищах многих бурых водорослей накапливается в значительных количествах. Так, ламинария цикориоподобная (*Laminaria cichorioides*) содержит около 15% ламинарана, фукус пузырчатый (*Fucus vesiculosus*) и фукус исчезающий (*Fucus evanescens*) продуцируют до 13% фукоидана (Звягинцева и др. 1998).

При промышленной организации переработки водорослевого сырья для различных нужд, особенно для получения лечебных или лечебно-профилактических препаратов, неизбежно возникнет проблема отбора видов с самым высоким содержанием требуемых компонентов в период их максимального накопления. В связи с этим изучение химических свойств метаболитов водорослей необходимо проводить совместно с исследованием их биологии и рассматривать это как комплексную задачу для каждого региона.

Биологические основы существования водорослей

Водоросли относятся к низшим растениям, главными отличительными признаками которых является отсутствие у них настоящих корней, стеблей и листьев. Корни у высших растений всасывают из почвы питательные вещества, а у водорослей (ризоиды, подошва, диск и др.) служат только как органы прикрепления к субстрату, а поглощение питательных веществ из воды происходит всей поверхностью их слоевищ.

Развитие водорослей зависит от наличия в водной среде макро- и микроэлементов, которые используются для построения их органов и тканей. Поглощение биогенов и микроэлементов происходит за счет всасывающей силы клеток водорослей, являющейся результатом разницы осмотического давления внутриклеточного сока растения и морской воды. Крупные морские водоросли относятся к гиперосмотическим организмам, у которых их клеточное осмотическое давление (30 – 60 атм) превышает внешнее осмотическое давление воды с океанической соленостью (около 23 атм) в 2–3 раза. (Библь, 1972; Камнев, 1989). Разница между величинами осмотического давления клеток водорослей и морской воды позволяет водорослям поглощать воду с растворенными в ней питательными веществами. Элементы и их соединения, относящиеся к макроэлементам, называемые биогенными веществами или биогенами, требуются водорослям в сравнительно больших количествах. Особая роль среди них принадлежит азоту и фосфору. Азот входит в состав всех белковых молекул и отвечает за развитие репродуктивных тканей, а фосфор — обязательный компонент ядерного вещества, играющий также значительную роль в окислительно-восстановительных реакциях. Кальций используется водорослями как для построения тела (красные известковые корковые водоросли), так и является компонентом солей клетки и регулирует осмотические функции. Магний входит в состав хлорофилла — основного фотосинтезирующего пигмента всех систематических групп водорослей. Микроэлементы необходимы водорослям в небольших количествах, но их содержание в воде также незначительно. Однако роль их в обмене веществ водорослей крайне велика. К наиболее

важным микроэлементам, которые необходимы водорослям, относятся 10 элементов: железо, марганец, цинк, медь, бор, кремний, молибден, хлор, ванадий, кобальт. С физиологической точки зрения их можно разделить на три группы: 1) вещества, необходимые для фотосинтеза: марганец, железо, хлор, цинк и ванадий; 2) вещества, необходимые для азотного обмена: молибден, бор, кобальт, железо; 3) вещества, необходимые для других метаболических функций: марганец, бор, кобальт, медь и кремний.

В морских водоемах концентрации растворенных биогенных веществ, таких как нитраты и фосфаты, часто низки и являются лимитирующими факторами для развития водорослей, в отличие от хлористого натрия, которого хватает с избытком. Подкормка слоевищ культивируемой ламинарии растворами солей мочевины и фосфорнокислого натрия из расчета 100 г/м³ азота (при соотношении N:P как 14:1), проведенная на плантациях в прибрежье северного Приморья, способствовала увеличению их биомассы практически в два раза (Крупнова, 2002).

Приток биогенов к слоевищам водорослей обеспечивается движением воды. От интенсивности этого движения и его изменения во времени будет зависеть как биологическое состояние водорослей, так и их товарные качества — темпы роста, содержание сухих веществ и воды в талломах, ежегодно продуцируемая биомасса, репродуктивный потенциал и, как следствие, способность к самовосстановлению полей, а также биохимический состав их тканей. Очевидно, что знание особенностей режима водной среды является основой всестороннего понимания закономерностей роста водорослей в природе и возможности управления их ресурсами. Бурые водоросли обладают значительными биомассами и особенно нуждаются в притоке биогенов. Благоприятное их существование на Приморском шельфе обеспечивают воды Приморского холодного течения, обладающего необходимыми для этих водорослей особенностями гидрологического режима — низкая температура воды летом, размытый пикноклин, обеспечивающий поступление биогенов в эвфотический слой, значительные скорости, способствующие притоку новых порций биогенов. Межгодовые изменения режима вод Приморского течения отражаются на состоянии полей бурых водорослей и проявляются в параметрах их общебиологических характеристик (Крупнова, 2004), в связи с чем степень изученности Приморского течения является залогом успешного прогнозирования их урожайности.

Систематика бурых водорослей и их распространение

В соответствии с систематикой, принятой русскими альгологами (Голлербах, Полянский, 1951; Жизнь растений, 1977), выделено десять отделов

водорослей (табл. 1.1). Разделение водорослей на систематические таксоны высшего ранга — отделы — в основном проводится по их окраске, которая определяется преобладанием главного пигмента. Фикоциан, фикоэритрин, каротин, ксантофилл, фукоксантин — пигменты, придающие водорослям красную, бурую, желто-зеленую окраску, маскируя основную зеленую.

Бурые водоросли, как показали молекулярно-филогенетические исследования, возникли около 170—270 миллионов лет назад (Medlin et al. 1997). Их относят согласно (Белякова и др, 2006) к отделу Phaeophyceae. Они являются многоклеточными фотоавтотрофными организмами, в настоящее время объединенными в 15—19 классов, 47—50 семейств, включающих около 285 родов и, по разным данным, от 1792 до 2500 видов (Reviere et al., 2007; Phillips et al., 2008).

Таблица 1.1

Классификация водорослей

Название отдела	
Латинское	Русское
Cyanophyta	Синезеленые
Pyrophyta	Пирофитовые
Chrysophyta	Золотистые
Bacillariophyta	Диатомовые
Xanthophyta	Желтозеленые
Phaeophyta	Бурые
Rhodophyta	Красные
Euglenophyta	Эвгленовые
Chlorophyta	Зеленые
Charophyta	Харовые

Бурые водоросли, наряду с диатомовыми, являются главными продуцентами первичной продукции в гидросфере. Они играют определяющую роль в глобальном цикле углекислого газа за счет фиксации углекислоты и связывания растворенной органики и последующего перевода ее в глубинные слои водной толщи. Условия их обитания крайне разнообразны — это пресные воды, почва и, в особенности, морская среда, где они являются основой морских «лесов» в прибрежных экосистемах. Они широко распространены от субполярных зон до экватора, однако наибольшего разнообразия достигают в холодноводных и умеренных морях. Их размеры варьируют от нескольких миллиметров до 40 метров в длину у макроцистиса (*Macrocystis pyrifera*). Бурый (коричневый) цвет их талломов является следствием содержания некоторых каратиноидных пигментов, в частности, фукоксантина и виолаксантина. Их клеточные

стенки содержат целлюлозу, альгиновую кислоту и фукоиданы.

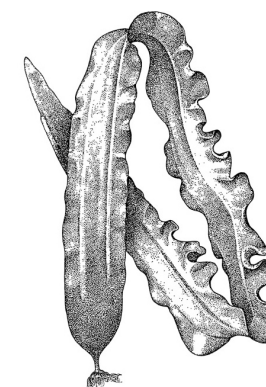
Наибольшего внимания из бурых водорослей заслуживают ламинариевые (*Laminariales*) и фукусовые (*Fucales*), поскольку в эти порядки входят крупные промышленные виды, содержащие полезные вещества в максимальных количествах. Порядок ламинариевых по одной из современных классификаций включает пять наиболее перспективных в промышленном отношении семейств: аляриевые (*Alariaceae*), хордовые (*Chordaceae*), костариевые (*Costariaceae*), ламинариевые (*Laminariaceae*) и лессониевые (*Lessoniaceae*), фукусовые включают два семейства — фукусовые (*Fucaceae*) и саргассовые (*Sargassaceae*).

Поля ламинариевых водорослей — широко представленные и наиболее структурированные комплексы бурых водорослей — в совокупности носят название келп (*kelps*). Они являются значительным флористическим компонентом побережья в нижней эулитеральной и сублитеральной зонах умеренных и полярных морей. Растения ламинариевых состоят из спорофита, разделенного на пластину (таллом) с интеркалярной меристемой у ее основания (зона роста), ризоида (органы прикрепления), черешка. Ризоиды, в основном, разветвленные, крепко прикрепляются к субстрату, обеспечивая устойчивость всему растению в условиях прибойности.

Такие представители ламинариевых и фукусовых водорослей как ламинария японская, костария ребристая, ламинария цикориевидная, ламинария Гурьяновой, ламинария прижатая (аппрессириза), ламинария наклоненная (инклинаториза), алярия окаймленная (маргината), ундария, саргассумы и фукусы — наиболее изученные макрофиты. Они образуют промышленные запасы и легко поддаются культивированию, что может являться залогом организации необходимой сырьевой базы для производства из них полезных веществ.

Сахарина [=Ламинария]
японская (*Saccharina japonica* (Areschoug) Lane, Mayes, Druehl et Saunders) — один из самых распространенных видов бурых водорослей в Дальневосточных морях (Рис. 1.1)

В настоящее время активизировались исследования в области пересмотра систематического статуса бурых водорослей с использованием генетического анализа, об-



Empire Eukaryota
Kingdom Chromista
Subkingdom Harosa
Infrakingdom Heterokonta
Phylum Ochrophyta
Subphylum Phaeista
Infraphylum Marista
Superclass Fucistia
Class Phaeophyceae
Order Laminariales
Family Laminariaceae
Genus *Saccharina*

Рис. 1.1. *Saccharina japonica* (Areschoug) Lane, Mayes, Druehl et Saunders)

условленные тем, что часто дивергенция морфологических признаков существующих видов ламинариевых водорослей или их форм выражена слабо и иногда перекрывается морфометрическими характеристиками популяций. При проведении молекулярно-генетического анализа на основе сравнения нуклеотидных последовательностей фрагментов ДНК разных видов ламинарий установлено, что единый крупный род *Laminaria* в самом деле может быть разделен на 2 рода, а ламинария японская отнесена в новый выделенный род *Saccharina*, и получила новое название — *Saccharina japonica* (Lane et al., 2006). Под этим названием она в настоящее время цитируется в научной литературе.

Приводим таксономическое положение ламинарии японской (*Saccharina japonica* (Areschoug) C.E.Lane, C.Mayes, Druehl et G.W.Saunders) согласно современной систематике по данным Algaebase (Рис. 1.1).

Однако в связи с тем, что традиционно на протяжении многих лет эта водоросль называлась ламинарией японской и для понимания между наукой и промышленностью, мы предлагаем использовать в качестве промышленного названия прежний термин — ламинария японская. Ламинария японская имеет двухгодичный гетероморфный цикл развития с чередованием поколений: диплоидный спорофит (взрослое растение) сменяется на микроскопические гаплоидные мужской и женский гаметофиты. Осенью на втором году жизни пластины ламинарии (спорофит) продуцируют спороносную ткань, в спорангиях которой развиваются зооспоры. После выхода из спорангиев в морскую воду зооспоры прикрепляются к каменистому субстрату на дне моря и прорастают в микроскопические женские и мужские гаметофиты, которые в свою очередь продуцируют половые мужские и женские клетки — антеридии и архегонии. Сливаясь, половые клетки образуют зиготу, из которой развиваются спорофиты, достигающие к маю длины до 1–2 м и массы до 300 г. К лету второго года жизни спорофиты приобретают длину в среднем до 2–3 м и массу до 600–1000 г. (Рис. 1.2). Общая урожайность полей ламинарии в значительной степени зависит от условий развития ее ранних стадий – зооспор и гаметофитов. При этом температура воды является лимитирующим фактором, оптимальными значениями которой являются диапазон от 15 до 80°C. Чем длиннее такой период осенью, тем больше зооспор может реализоваться и дать жизнь новому поколению, тем выше урожай товарной ламинарии через год.

Запасы ламинарии японской до 60-х годов прошлого столетия составляли до 300 тыс. т (Суховеева, 1969), по данным Лаборатории водорослей (ТИНРО-центр) в настоящее время они находятся на низко-стабильном уровне в пределах от 4 до 40 тыс. тонн.

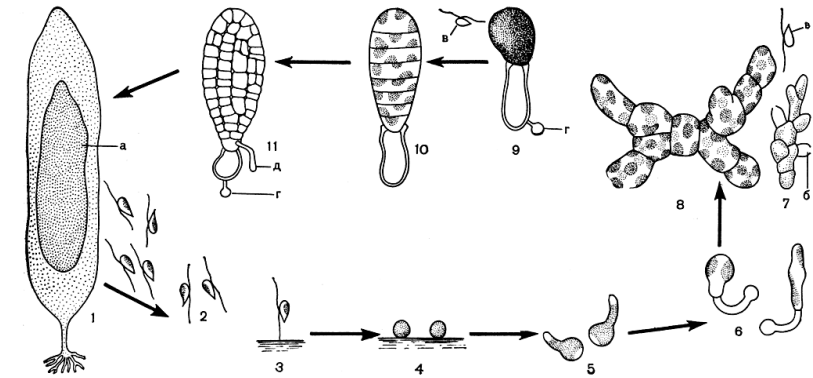


Рис. 1.2. Стадии развития ламинарии японской:

1 — слоевище со спорами: а — пятно спорангиев; 2 — плавающие зооспоры; 3 — зооспора прикрепилась передним жгутиком к грунту; 4 — эмбриоспоры; 5 — эмбриоспоры с проростковой трубкой; 6 — образование первых клеток гаметофитов (слева — женский, справа — мужской); 7 — мужской гаметофит: б — антеридий, в — антерозоиды; 8 — многоклеточный женский гаметофит; 9 — одноклеточный женский гаметофит после выхода яйцеклетки из оогония; г — оболочка эмбриоспоры; 10–11 — начало развития слоевища спорофита: д — первичный ризоид

Костария ребристая (*Costaria costata* (Turn) Saund. распространена в прибрежье Японского моря, у о. Сахалин и Курильских островов на глубинах от 0,5 до 20 м. (Рис. 1.3).

Однако в мае 2009 г. в районе северного Приморья на расстоянии нескольких миль от берега поселения костарии были найдены на глубине от 50 до 85 м. Растения были мелкими — длина слоевищ составляла 30–80 см, ширина — 4–5 см, в то время как в местах традиционного произрастания ее длина может достигать до 2–3 м и ширина — до 40–50 см при массе до 1 кг. В природе запасы костарии нестабильны и для прибрежья Приморья оцениваются для разных лет от 641 до 28 350 т (Денисова, Крупнова, 2011). Самостоятельных полей она, как правило, не образует, произрастает совместно с ламинарией японской и другими макрофитами. Пластины костарии снабжены пятью ребрами. Жизненный цикл ее развития составляет один год. Зооспоры в спороносной ткани созревают в период с мая по июль, видимые глазом спорофиты появляются в октябре–декабре и к маю–июню следующего года пластины достигают максимальной длины и массы, после чего разрушаются и жизненный цикл завершается.

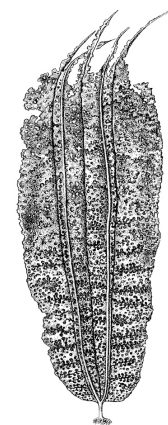


Рис. 1.3. *Costaria costata* (Turn) Saund

Сахарина [=Ламинария] цикориевидная (*Saccharina cichorioides* (Miyabe) Lane, Mayes, Druehl et Saunders) распространена практически вдоль всего побережья Японского и Охотского морей, встречается у западного и восточного побережий Сахалина, Курильских островов (Рис. 1.4).

Ее запасы оцениваются для всех дальневосточных морей в 100–150 тыс. т. (Сарочан, Вялов, 1981). Внешне она отличается от ламинарии японской волнистостью краев пластины и выпуклостями вдоль срединной полосы. Длина ее пластин может составлять от 0,5 до 5 м, масса от

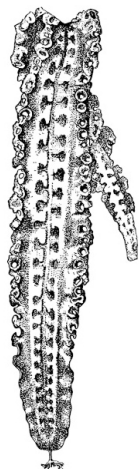


Рис. 1.4. *Saccharina cichorioides* (Miyabe) Lane, Mayes, Druehl et Saunders

200 до 800 г в зависимости от района произрастания. В побережье Приморья ламинария цикориевидная произрастает пятнами на каменистых, галечных и ракушечно-илисто-галечных грунтах на глубинах от 1 до 20 м. Иногда она прикрепляется к створкам беспозвоночных или встречается на поверхности пласта неприкрепленной анфельции. Для всего побережья Приморья в настоящее время ее запасы по экспертной оценке составляют около 4 тыс. т., из них большая часть приходится на Залив Петра Великого. Однако она легко поддается культивированию, что делает возможным получение необходимой биомассы этой водоросли для промышленной переработки. Экспериментальные работы по культивированию ламинарии цикориевидной на севере Приморья позволили получить до 80–100 т, а на юге Приморья — около 40 т с одного гектара подвесных плантаций (Крупнова, 2002; Крупнова и др., 2006).

Сахарина [=Ламинария] Гурьяновой (*Saccharina gurjanovae* (A.D. Zinova) Selivanova, Zhigadlova et G.I. Hansen) обитает в Японском море, как правило, на больших глубинах. Повсеместно встречается по всему материковому побережью Охотского моря, у западного и восточного побережий о. Сахалин, у восточного побережья Камчатки, в Беринговом и Чукотских морях (Блинова, 1969, 1971; Потехина, 1973; Клочкова, Березовская, 1997; Крупнова, 1998, 2005; Суховеева, Подкорытова, 2006) (Рис. 1.5).



Рис. 1.5. *Saccharina gurjanovae* (A.D. Zinova) Selivanova, Zhigadlova

Субстратом для ее произрастания обычно является каменистое дно, однако часто ее можно встретить на мелко-валунных и галечно-песчаных грунтах. Растения ламинарии Гурьяновой имеют длинный черешок до 30 см и широкую волнистую пластину до 70 см шириной без явно выраженной срединной полосы, масса может достигать до 3–4 кг при длине до 3–4 м. Общие ее запасы для всего ареала составляют 520 – 600 тыс. т (Потехина, 1973; Толстикова, 1982). В побережье Охотского моря она может образовывать мощные заросли.

Ламинария прижатая (*Laminaria appressirhiza* Ju. Petr. et V. Voz.) обитает в побережье Охотского моря, у юго-западного побережья Камчатки, вдоль Курильских островов (Петров, 1973; Крупнова, 1998, 2005; Клочкова, Королева, 2003) (Рис. 1.6).



Рис. 1.6. *Laminaria appressirhiza* Ju. Petr. et V. Voz.

Пластина рассеченная, черешок (стволик) длинный — до 40 см. Произрастает на глубинах от 0,5 до 12 м, чистых зарослей не образует, является постоянным компонентом фитоценозов с такими видами макрофитов как цистозира, лессония, фукус, ламинария наклоненная, ламинария Гурьяновой, тихокарпус, тауйя (Крупнова, 2005). Масса одного слоевища в период максимального созревания составляет от 200 до 700 г.

Ламинария наклоненная (*Laminaria inclinatorhiza* Ju. Petr. et V. Voz.) распространена в Охотском море и у Юго-Западного побережья Камчатки (Потехина, 1973; Клочкова, 1998; Крупнова, 1998, 2005) (Рис. 1.7). Пластина рассеченная или цельная длиной 0,5–1 м, черешок (стволик) длиной до 20–25 см. Масса одного слоевища составляет около 300–500 г.

Произрастает на глубине от 1 до 12 м. Чистых зарослей не образует, встречается в виде вкраплений в фитоценозах совместно с другими видами макрофитов — цистозирой, лессонией, фукусом, ламинарией наклоненной, ламинарией Гурьяновой, тихокарпусом, тауйей.



Рис. 1.7. *Laminaria inclinatorhiza* Ju. Petr. et V. Voz.

Алярия окаймленная (*Alaria marginata* Post. et Rupr.) распространена во всех Дальневосточных морях (Рис. 1.8). В прибрежье Приморья встречается от залива Ольги и далее на север (Петров, 1973). Пластина линейная, в верхней части рассеченная, длина от 0,5 до 4 м, ширина — 10–30 см, масса — от 100 до 800 г. Чистые заросли практически не образует, в Охотском море произрастает в фитоценозах совместно с цистозирой, лессонией, фукусом, ламинарией наклоненной, ламинарией Гурьяновой, тихокарпусом, тауйей.

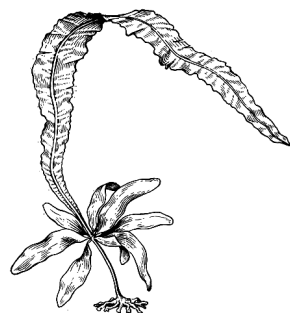


Рис.1.8. *Alaria marginata* Post. et Rupr.

Псевдолессония [=Лессония] ламинарие-видная (*Pseudolessonia laminarioides* (Postels & Ruprecht) Cho G.Y., Klochkova N.G., Krupnova T.N. & Boo) (Рис. 1.9). Произрастает только в прибрежье Охотского моря на глубинах от 1 до 10–12 м. Длина пластин взрослых растений составляет от 1 до 2,5 м, масса — 900–1000 г. Самостоятельных зарослей не образует, встречается в сообществе массовых видов макрофитов. Запасы оцениваются в 70–100 тыс. т. Филогенетическое изучение показало, что лессония из Охотского моря скорее принадлежит к предкам макроцистиса из северной части Тихого океана, чем к видам лессоний из южной части тихого океана, в связи с чем ей дано новое название — псевдолессония — или *Pseudolessonia* gen. nov. (Cho G.Y. et al., 2006).

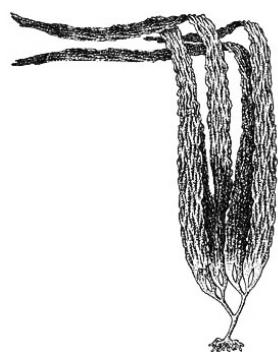


Рис. 1.9. *Pseudolessonia laminarioides* (Postels & Ruprecht). Cho G.Y., Klochkova N.G., Krupnova T.N. & Boo

Артротамнус двураздельный (*Arthrothamnus bifidus* (Gmel.) J. Ag.) распространен у Курильских островов, у западного и восточного побережий Камчатки, в прибрежье Охотского моря (Суховева, 1972; Крупнова, 1998, 2005) (Рис. 1.10). Произрастает на твердых грунтах на глубине от 0,5 до 30–40 м, длина пластин колеблется от 1 до 2–3 м, масса — от 100 до 900 г. Запасы составляют по разным данным от 350 до 500 тыс. т.



Рис. 1.10. *Arthrothamnus bifidus* (Gmel.) J. Ag.

Тауйя утолщенная (*Tauya basicrassa* Kloczc. et Krupn.) обитает в прибрежье Охотского моря (Рис. 1.11). Эта крупная водоросль, достигающая длины до 3–12 м и ширины до 150 см при массе более 3 кг, была



Рис. 1.11. *Tauya basicrassa* Kloczc. et Krupn

обнаружена сравнительно недавно — в 2000 г. Крупновой Т.Н. во время рейса по изучению водорослей и морских ежей в прибрежье Тауйской губы Охотского моря и затем описана как новый род (Крупнова, 1998, 2005; Ключкова, Крупнова, 2004). Проведенное изучение ее биохимического состава показало, что она содержит значительное количество маннита (до 4,8%), фукоидана (до 8%) и альгиновой кислоты до 11,4%, которые практически равномерно распределены во всех частях растения. В то же время содержание ламинарана в разных частях пластины различается значительно — у основания составляет 53,1%, в то время как в верхней части и в черешках с ризоидами равно 2,6% и 0,7% соответственно (Усов, Крупнова, 2005).

Эта водоросль произрастает только в Тауйской губе, в связи с чем ей и дано имя Тауйя. У самого берега на глубине от 0,5 до 5 м она входит в состав

фитоценозов макрофитов без четко выраженного доминирования того или иного вида. Длина ее пластин здесь варьирует от 50 до 200 см. У северо-западного побережья о. Недоразумения Тауйя образует мощные чистые заросли на площади около 300 000 м², где ее растения имеют максимальные размеры. Общий запас ее составляет около 8–10 тыс. т. Сосредоточение значительной биомассы этой водоросли на ограниченной площади является привлекательным для промышленной добычи. Следует понимать, что проведение активной добычи при недостаточном знании биологии и отсутствии наработок по биотехнологии воспроизводства и культивирования этого уникального вида может привести к его исчезновению.

Фукус исчезающий (*Fucus evanescens* Ag.) (Рис. 1.12) произрастает в прибрежье Японского моря на мелководье, но значительных зарослей не образует. В Охотском море запасы фукуса огромны — он образует обширные поля — до 70–100 м шириной и длиной до нескольких километров, которые обнажаются при отливе, когда осушается значительная часть литорали. Только для прибрежья залива Бабушкина в Охотском море запасы фукусовых составляют около 60 тыс. т. (Крупнова, 1998), а для всего Охотского моря определены в 1 мл. т (Возжинская и др. 1970).

Неограниченные запасы фукусовых водорослей позволяют широко использовать их в качестве сырья как для получения традиционной продукции (маннит и альгинаты), так и новой (ламинаран и фукоидан), и разрабатывать на их основе перспективные лекарственные формы, удобные в применении и стабильные при хранении.

Информация о размерно-массовых характеристиках и запасам бурых водорослей приведена в Таблице 1.2 (Суховеева, Подкорытова, 2006).



Рис.1.12. *Fucus evanescens* Ag.

Таблица 1.2
Сводные данные по биомассе, плотности поселения, массе слоевища и запасам бурых водорослей

Вид водоросли*	Масса слоевища (кг)	Плотность экз./м ²	Биомасса кг/м ²	Запасы, тыс.т
Промысловые виды				
Ламинария японская — <i>Laminaria japonica f.japonica</i>	0,4–7,0	2–140	0,4–156,0	500–920
Ламинария японская, глубинная — <i>Laminaria japonica f.longipes</i>	1,0–5,7	2–110	5,0–100,0	5–75
Ламинария Гурьяновой — <i>Laminaria gurjanovae</i>	0,1–3,7	4–56	0,4–80,0	520–600
Ламинария узкая — <i>Laminaria angustata</i>	0,2–3,0	10–35	2,0–65,0	200–250
Ламинария зубчатая — <i>Laminaria dentigera</i>	0,1–0,5	1–25	0,2–36,0	200–250

Ламинария наклоненная — <i>Laminaria inclinatorhiza</i>	0,1–0,5	2–12	0,1–7,2	50–75
Ламинария прижатая — <i>Laminaria appressirhiza</i>	0,25–0,7	3–15	0,3–2,5	
Ламинария длинностовольная — <i>Laminaria longipes</i>	0,2–0,7	3–40	1,8–20,0	100–150
Ламинария йезоенская — <i>Laminaria yezoensis</i>	0,2–2,0	3–15	0,5–11,0	70–100
Ламинария Бонгарда — <i>Laminaria bongardiana</i>	0,3–2,5	5–50	0,5–16,5	500–700
Циматера японская — <i>Cymathaere japonica</i>	0,4–1,5	5–30	2,0–54,0	70–100
Циматера волокнистая — <i>Cymathaere fibrosa</i>	0,1–0,6	2–25	1,0–29,0	100–150
Артротамнус двураздельный — <i>Arthrothamnus bifidus</i>	0,1–0,9	20–68	0,1–50,0	350–500
Лессония ламинариевидная — <i>Lessonia laminarioides</i>	0,05–0,95	1–210	0,2–6,2	70–100
Алария полая — <i>Alaria fistulosa</i>	0,2–7,5	2–10	1,0–54,0	12000
Потенциально промысловые виды				
Ламинария цикоревидная — <i>Laminaria cichorioides</i>	0,03–0,75	3–200	0,01–88,0	100–150
Костария ребристая — <i>Costaria costata</i>	0,025–0,43	5–130	0,4–24,0	70–100
Челлманиелла толстолистная — <i>Kjellmaniella crassifolia</i>	0,2–1,5	20–50	4,0–30,0	17–20
Челлманиелла кольцевая — <i>Kjellmaniella gyrate</i>	0,01–0,3	2–15	0,1–5,0	3–5
Артротамнус курильский — <i>Arthrothamnus kurilensis</i>	2,5–6,0	25–50	0,5–57,0	700–1000

Вид водоросли	Масса сло- евища (кг)	Плотность экз./м2	Биомасса кг/м2	Запасы, тыс.т
Циматера трехскладчатая — <i>Cymathaeae triplicata</i>	0,2—0,5	5—20	8,0—27,0	50—100
Алария окаймленная — <i>Alaria marginata</i>	0,08—0,8	5—60	0,1—15,0	100—150
Алария охотская — <i>Alaria ochotensis</i>	0,05—2,0	5—30	0,1—3,0	25—30
Агарум решетчатый — <i>Agarum clathratum</i>	0,03—0,5	1—15	0,2—11,2	100—150
Талассиофиллум решетчатый — <i>Thalassiophyllum clathrus</i>	0,2—1,5	2—23	1,5—60,0	35—50
Фукус исчезающий — <i>Fucus evanescens</i>	0,03—0,5	5—630	0,5—70,0	500—700
Сильвеция Бабингтона — <i>Silvetia babingtonii</i>	—	10—450	5,0—44,0	75—100
Саргассум бледный — <i>Sargassum pallidum</i>	0,02—9,5	1—3	0,05—30,0	75—100
Саргассум Миябе — <i>Sargassum miyabei</i>	0,5—7,0	2—6	0,5—15,0	50—75
Цистозира толстоногая — <i>Cystoseira crassipes</i>	0,05—6,5	3—5	0,2—30,0	8500—9500
Итого			25 135-28 200	

* название водорослей приведено в соответствии со старой систематикой

Данные таблицы свидетельствуют, что многие макрофиты дальневосточных морей имеют достаточные промысловые запасы и могут использоваться в различных отраслях хозяйственной деятельности человека. В целях рационального использования их природных запасов необходимо значительное расширение и углубление знаний биологии, химического состава и сберегающих технологиях переработки. При недостаточном

запасе наиболее ценных в хозяйственном отношении видов водорослей представляется целесообразным разрабатывать биотехнологии восстановления их природных полей и культивирования, что позволит получать сырье с заданными товарными качествами и в требуемых объемах.

Воспроизводство и культивирование

В настоящее время в экономике многих стран выращиванию водорослей уделяют большое внимание. Это направление индустрии получило особенное развитие в государствах с большой протяженностью береговой линии, где исторически складывались условия для употребления водорослей в пищу и для бытовых нужд. Еще с давних времен население прибрежных территорий собирало обитателей побережья для еды, и водоросли, как наиболее легкодоступный объект, постоянно употреблялись в пищу. С исчезновением водорослей в доступных местах стали развиваться навыки их культивирования, сложившиеся со временем в стройные биотехнологии выращивания в промышленных масштабах. К началу третьего тысячелетия в странах Азиатско-Тихоокеанского региона урожай выращенных водорослей измеряется миллионами тонн. Наиболее развито водорослеводство в Японии, Южной Корее, Китае, Северной Корее, Филиппинах, Таиланде, Вьетнаме, Индии.

В 2008 году в секторе аквакультуры было произведено 15,8 млн. тонн водных растений (в эквиваленте живого веса) общей оценочной стоимостью в 7,4 млрд. долл. США. В совокупном объеме мировой добычи водных растений за тот же год на аквакультуру приходится 93,8%. Культивирование водных растений постоянно растет с 1970 года, в среднем, увеличиваясь на 7,7% в год. В ассортименте продукции преобладают морские водоросли (99,6% по количеству и 99,3% по стоимости). Страны Восточной и Юго-Восточной Азии лидируют в культивировании морских водорослей и производят их до 99,8% по количеству и 99,5% по стоимости (Состояние рыболовства и аквакультуры, 2010) от мирового уровня их добычи.

Одним из несомненных лидеров, как по валовой продукции выращенных водорослей, так и по количеству культивируемых видов, является Япония. Водоросли употребляют здесь как в сыром виде для приготовления салатов, гарниров, так и в сушеном виде для использования в разнообразных супах, приправах, пастах и т.д. Из них получают лекарственные вещества, желирующие и стабилизирующие основы для пищевой промышленности, парфюмерные добавки. Береговая полоса этой страны, слагаемая из побережий четырех главных островов (Хонсю, Сикоку, Кюсю и Хоккайдо), которые вместе с более, чем 4000 небольшими островами, составляет Японский Архипелаг, имеет протяженность

около 3000 км. Урожай культивируемых на плантациях водорослей в этой стране оценивается в 615000 т сырого веса, что составляет 94,6 % общей массы всех добытых водорослей, включая и собранные с природных полей. Такой успех марикультуры водорослей, несомненно, связан с многолетним опытом и давними традициями. Так, культивирование красной водоросли порфиры, носящей в Японии название «нори», начато в Японии более, чем 500 лет назад. К настоящему времени разработаны многочисленные вариации биотехнологии ее культивирования, что позволило увеличить площади под ее выращивание, которые занимают побережье в 62000 га. Общая биомасса выращенной порфиры составляет 400000 т сырого веса и оценивается US\$ 1,5 миллиардов.

Технологии культивирования зеленых водорослей — монострома, и бурых — ундария и ламинария — начаты всего около 30 лет назад. Немного ранее — в 1955 г — заложены первые плантации ундарии (японское название «вакаме»), традиционной и любимой пищи японского народа, но уже в 1994 г ее урожаем составил 88283 т.

Ламинария, которая употребляется в Японии в пищу, носит общее название «комбу» и включает следующие виды: *L. japonica*, *L. ochotensis*, *L. religiosa*, *L. diabolica*, *L. angustata*, *L. longissima*. Главным образом культивируют *L. japonica*.

Первый урожай ламинарии японской в промышленных масштабах был получен в 1970 г. В настоящее время ее выращивают на Хоккайдо и на севере Японии, как в двухгодичном, так и в одногодичном «форсированном» режиме. Суммарный вес продукции с плантаций равен 53000—72000 т, что составляет около 30% от общего объема добытой ламинарии (Hasegava, 1976).

В Южной Корее для выращивания водорослей используют также всю прибрежную полосу материковой части страны и островных территорий. Более чем 30 видов водорослей употребляют в пищу, наиболее популярными являются — порфира, ундария, ламинария, саргассум, энтероморфа, кодиум. Урожай порфиры к 1994 г составил 270000 т, ундарии — 410000 т, ламинарии — 11000 т. В технических целях, в частности для получения исходного материала для получения агара, каррагинана и альгинатов, культивируют гелидиум, эухему, эклонию.

В Северной Корее культивируют ламинарию японскую, грацилярию, ундарию. Плантации с водорослями тянутся вдоль всего побережья страны со стороны Японского и Желтого морей. Большие успехи достигнуты в области селекции теплоустойчивых сортов ламинарии. Литературных сведений по режимам выращивания водорослей в этой стране практически нет. Однако в результате договора между Инсти-

тутом марикультуры Восточного моря (КНДР, г. Вонсан) и ТИПРО специалисты последнего посетили районы выращивания водорослей в этой стране и получили интересные оригинальные сведения.

Учеными Северной Кореи разработаны простые и эффективные биотехнологии выращивания водорослей. Так, ламинария растет в Северной Корее в одногодичном цикле из-за того, что летом она не может пережить высокие температуры воды (до 26—28°) и на плантациях разрушается. Из-за бедности и отсутствия каких-либо технических возможностей проблема создания условий обеспечения хранения штаммов (образцов) культур ламинарии решена следующим образом. Для сохранения ценных сортов и работы с ними поступают так: оспоренные хлопчатобумажные нити наматывают на треугольные металлические каркасы и помещают их на дно емкостей с морской водой. Все это обтягивают полиэтиленовой пленкой и ставят в прохладное место и не выключают электричество в течение всего периода хранения гаметофитов. Раз в 2—3 дня подливают морскую воду. Вода орошает нити с зачатками ламинарии, поднимаясь из емкости по нитям как по капиллярам или испаряясь с поверхности пленки, куда попадает в результате конденсации. Поскольку свет не выключают, фотопериода нет и гаметофиты ламинарии не развиваются. Так можно хранить культуры очень долго — до года и более. Рассада начинает развиваться по мере необходимости, когда нити с гаметофитами переводятся в море на плантацию или же в бассейны.

Очень интересным биотехнологическим моментом, который может пригодиться при выращивании рассады ламинарии в условиях Приморья, является задержка ее развития в цеховых условиях. В море используют рассаду цехового выращивания, при этом оспоривание субстратов проводят при очень высокой температуре воды, равной 22—24°С. Обычно при таких значениях температуры воды зооспоры гибнут. Для предотвращения их гибели корейские ученые разработали специальный раствор, который добавляется в воду бассейнов с оспоренными рамками. Основу этого раствора составляет $ZnCl_2$. Охлаждение температуры воды в бассейнах первоначально до 15—14 °С, как это принято во многих странах, не производят из-за экономии электроэнергии. Снижение температуры воды проводят только тогда, когда она в море начинает понижаться. Так, в 2009 г оспоривание рамок было проведено 20 августа при температуре воды 21°С. Снизили температуру только в конце сентября до 12°С, а затем в конце октября при температуре воды в море 16°С, рассаду высадили на плантацию. Такой технологический регламент выработан для «консервации» зооспор, поскольку маточные слоевища к концу августа из-за длительного периода с высокими температурами

уже разрушаются, и чтобы сохранить зооспоры, их осаждают на рамки в бассейны с высокой температурой воды (равной таковой в море), где их развитие не происходит. Однако они и не гибнут, поскольку в бассейны внесен $ZnCl_2$ — соль, предотвращающая их гибель. И только перед самым выносом рамок в море — в конце сентября — в бассейнах создаются температурные условия, позволяющие зооспорам начать свое дальнейшее развитие в гаметофиты и рассаду.

В Китае прибрежная полоса материковой части страны занимает 16135 км и 11674 км островных территорий. Индустриальное развитие марикультуры водорослей началось здесь в 1950 г. В настоящее время выращивают более миллиона тонн сырца водорослей, включая ламинарию, ундарию, порфиру, эухему и грацилярию. На один только Китай приходится 62,8% всего мирового объема производства морских водорослей. Ламинария японская в природных условиях в этой стране не растет. Она была завезена сюда из Японии в 1927 г и благодаря разработке селекционных методов получения теплоустойчивых сортов широко культивируется на плантациях Китая (Цзен Чен Куй, У Чжао Юань, 1956; Chaoyuan W, 1998).

Во Вьетнаме, Таиланде, Малайзии, Индонезии, Республике Бангладеш, Индии, Мексике, Перу, Чили, Бразилии, на Филиппинах культивируют в основном агарофиты. Это, в первую очередь, грацилярия, гелидиум и гигартина. Для пищевых целей используют в основном природные заросли каулерпы, энтероморфы, порфиры и др. В Индии широкое развитие получило выращивание энтероморфы и ульвы на искусственных сооружениях. В США культивируют порфиру, нереоцистис и макроцистис как для пищевых целей, так и для получения из них альгинатов. Выращенные талломы макроцистиса используют как субстрат для прикрепления икры рыб во время нереста. Водоросли в Англии (ламинария сахаристая, алярия), Норвегии (аскофиллум, ламинария северная, ламинария пальчатая, алария), Австралии, (макроцистис, дирвиелла), Канаде (аскофиллум, хондрус, нереоцистис, родимения), Испании (гелидиум, ундария) не культивируют, но активно эксплуатируют их природные поля для промышленных нужд на рациональной основе с учетом знаний биологии и методов воспроизводства добываемых видов.

Широкое развитие марикультуры водорослей обусловлено различными причинами. Если в странах третьего мира водоросли выращивают для борьбы с голодом, то в развитых странах употребление водорослей относится к культуре питания и связано с заботой о своем здоровье.

В прибрежье северо-западной части Японского моря наиболее массовым и промысловым видом является ламинария японская, которая до 80-ых годов прошлого столетия произрастала практически повсеместно от уреза

воды и до глубины 15—20 м. В последнее время запасы этой водоросли в прибрежье Японского моря находятся в угнетенном состоянии. Первоначально это было отмечено для побережья Японии, где явление резкого уменьшения зарослей крупных бурых водорослей в традиционных местах произрастания и замещения их другими малоценными мелкими видами в основном из семейства Corallinaceae, получило название «Исояке» (Suzuki et al., 1995; Fujita, 2010). Затем это явление распространилось к Сахалину, и, наконец, стало развиваться и у берегов Приморья.

У побережья Сахалина в период с 1950 по 1990 гг. заросли ламинарии тянулись сплошной широкой полосой в 100—200 м от м. Тукотан до р. Шebuнинка и занимали все каменистые субстраты на глубине от 0,5 до 20 м. В настоящее время происходит значительное сокращение их площадей и вытеснение их видами семейства Corallinaceae. За последние пятьдесят лет площадь произрастания ламинарии уменьшилась почти в два раза. Ее заросли сохранились в основном на глубинах 0,5—1 м, средняя ширина их составляет 40—70 м. Соответственно, почти в 7,6 раза сократились промысловые запасы, составляющие к настоящему времени около 3,3 тыс. т. (Балконская, Шпакова, 1999). У берегов Приморья также наблюдается значительное сокращение полей этой водоросли и ее запасы, оцениваемые в 1965 г. в 350 тыс. т (Суховеева, 1969), уменьшились к настоящему времени в десятки раз (Рис. 1.13, А,Б).

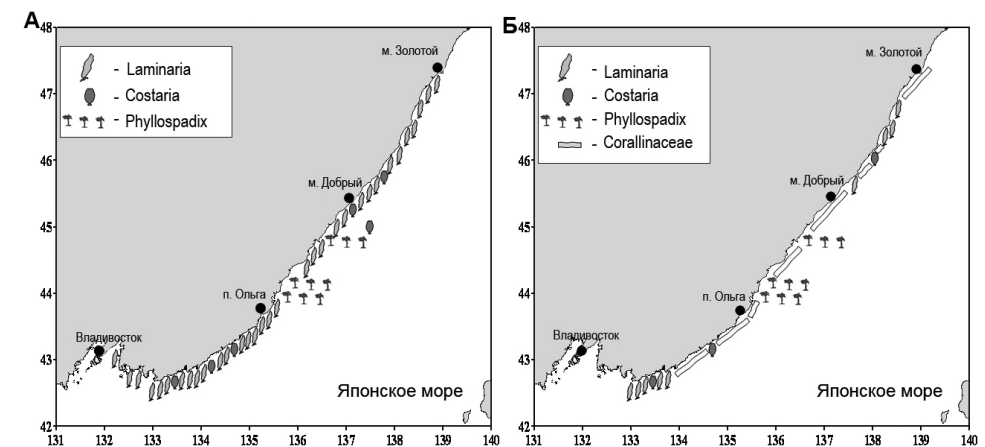


Рис. 1.13. Распределение полей ламинарии в 60—80-ые годы прошлого века (А) и современное распределение полей ламинарии (Б)

Единой и доказательной точки зрения на причины, вызывающие уменьшение запасов ламинарии, пока не существует ни в России, ни в Японии. Наиболее часто это связывают с антропогенными нарушениями природной среды, с чрезмерным промыслом, или, наконец, с выеданием

водорослей морскими ежами. В настоящее время поля ламинарии в прибрежье Приморья сохранились на тех участках, где ее промысел не проводился на протяжении десятков лет и где маточных слоевищ достаточно для оспоривания субстрата. На других участках ее традиционного произрастания — там, где маточные слоевища встречаются единично или отсутствуют полностью — активно развиваются конкуренты за субстрат — в основном поселения известковых корковых водорослей, которые являются многолетними видами и занимают субстрат надолго (Рис. 1.14).

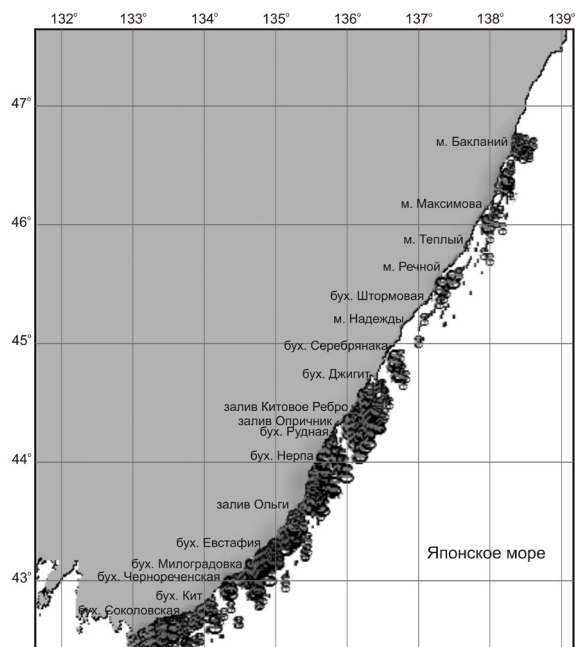


Рис. 1.14. Распределение полей корковых водорослей в 2011 г.

По нашему мнению снижение запасов ламинарии является следствием неблагоприятного воздействия комплекса факторов, которые можно условно подразделить на природные и антропогенные. К природным факторам относится нестабильность океанолого-климатических условий в период развития наиболее чувствительных к воздействию неблагоприятных условий среды ранних стадий этой водоросли — зооспор и гаметофитов, основным из которых является укорачивание периодов с благоприятной температурой воды (Рис. 1.15).

К антропогенным факторам — водолазный способ добычи в том виде, который практикуется до сих пор. Водолазами срезаются только сами слоевища, а на дне остаются ризоиды с черешками и даже частью слое-

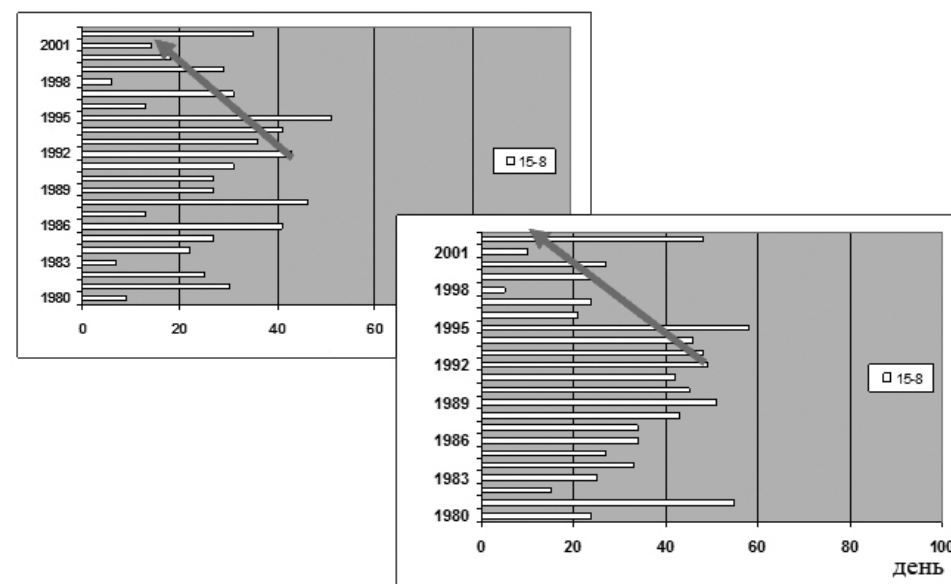


Рис. 1.15. Длительность периодов с благоприятной для развития ранних стадий ламинарии температурой воды (15—8°C). Стрелками показана тенденция к укорачиванию длительности таких периодов

вищ, что приводит к занятости донного каменистого субстрата к периоду выхода зооспор ламинарии ее остатками, и что в свою очередь создает препятствие для заселения субстрата ее же зооспорами (Крупнова, 2009).

Вырубка лесов на водосборных площадях рек, впадающих в северо-западную часть Японского моря, привела к сокращению листового опада и, как следствие, к снижению количества биогенных элементов, приносимых стоком рек в зону произрастания ламинарии (Чудаева, 1976, 1979; Оприцова, 1978, 1991; Жильцов, 2008). Недостаток питательных элементов отразился на размерно-массовых показателях слоевищ, вызвал их измельчение, а также привел к сокращению объемов продуцирования репродуктивной ткани по сравнению с 70-ми годами (Крупнова, 2002).

Исходя из мониторинга запасов ламинарии и состояния ее полей, может быть сделан вывод о роли лимитирующих факторов для воспроизводства этой водоросли для разных лет и предложены меры для сохранения ее ресурсов. Первоначально, при еще достаточном запасе ламинарии, лимитирующими факторами его падения явилось непринятие мер по снижению прессы добычи в годы с неблагоприятными условиями для развития ранних стадий, а также водолазный промысел, в настоящее время — отсутствие маточных слоевищ на значительной части прибрежья.

Поскольку ламинария японская относится к флюктуирующим короткоцикловым быстрорастущим видам, имеющим высокую плодовитость и значительные колебания урожайности поколений, данную ситуацию можно рассматривать как долговременную сукцессию, которая может развиваться на протяжении неопределенного количества лет и затем восстанавливаться в первоначальном виде. Однако в настоящее время на значительной части донного каменистого субстрата побережья Приморья маточные слоевища ламинарии отсутствуют или находятся в разреженном состоянии и это может привести к необратимости восстановления фитоценозов с доминированием ламинарии.

Изменить ситуацию возможно только с помощью мелиоративных мер, т. е. для восстановления полей ламинарии в традиционных местах ее обитания необходимо завозить туда маточные слоевища и после их стимуляции размещать на дно с тем, чтобы вышедшие зооспоры прикрепилась к свободному субстрату и дали жизнь новому поколению. Такая мера применяется в практике агрономии и носит название управляемых сукцессий (Миркин, 1989), одним из видов которых является рекультивационные сукцессии, при которых воссоздаются сообщества, близкие по своему составу к уничтоженным человеком или исчезнувшие за счет влияния других факторов (Скрипчинский, 1983).

Могут быть предложены следующие меры борьбы с уменьшением запасов ламинарии:

- запретить добычу слоевищ без ризоидов для освобождения субстрата к периоду оседания зооспор;
- снизить пресс добычи товарной ламинарии, закладка урожая которой происходила в годы с короткими благоприятными периодами для развития зооспор;
- проводить работы по восстановлению полей ламинарии на традиционных участках ее произрастания, в том числе на субстрате, покрытом корковыми водорослями и в годы с преобладанием первогодних растений;
- для увеличения сырьевой базы ламинарии необходимо развивать культивирование на подвесных и донных плантациях.

Такие меры в настоящее время активно внедряются на основе разработанных ФГУП «ТИНРО-Центр» биотехнологий культивирования ламинарии на подвесных и донных плантациях (Рис. 1.16), а также за счет проведения мероприятий по восстановлению ее природных полей (Крупнова, 1984, 2008).

Урожайность плантаций в южных районах побережья Приморья составляет около 40–60 т с га, в северных — от 70 до 120 т с га. Подвесное культивирование ламинарии обеспечивало в побережье Приморья в

80–90 годы прошлого столетия получение ежегодного урожая в количестве около 5 тыс. т. Плантации занимали около 200 га акватории побережья.

На подвесных плантациях создается возможность выращивать урожай водорослей с заданными товарными качествами, содержащими необходимые вещества в максимальных количествах. Регулирование горизонтов выращивания, создание различных плотностных режимов на единицу субстрата и селекционные работы по отбору наиболее перспективных



Рис. 1.16. Культивируемая ламинария на подвесных плантациях

к продуцированию требуемых веществ растений являются основой для получения урожая с заданными товарными характеристиками. Так, если выращивать ламинарию у поверхности воды в разреженном состоянии, то содержание маннита в ее слоевищах увеличивается. При больших плотностях растений на субстрате-поводце и культивировании их на глубине 8–15 м от поверхности воды увеличивается содержание минеральных веществ. Выращивание ламинарии с использованием донных конструкций может дополнять подвесное выращивание и проводится преимущественно в замерзающих зимой бухтах.

В последние годы разрабатываются методы восстановления полей ламинарии в традиционных местах ее обитания путем оспоривания природного дна зооспорами ламинарии (Рис. 1.17, а).

Сокращение запасов ламинарии негативно отразилось на кормовой базе морских ежей. Ламинария считается наиболее важной пищей для морских ежей, так как способствует продуцированию качественной икры с хорошими количественными показателями. Питание ежей на ламинариевых плантациях даже при низких рационах увеличивает их соматический и гонадный рост, повышает репродуктивный эффект и плодовитость (Крупнова, Павлючков, 2000, 2003; Крупнова, 2008). В связи с этим разрабатываются биотехнологии создания полей ламинарии для питания ежа, основанные на знании его суточных рационов и закономерностей биотических взаимоотношений с ламинарией (Рис. 1.17, б).

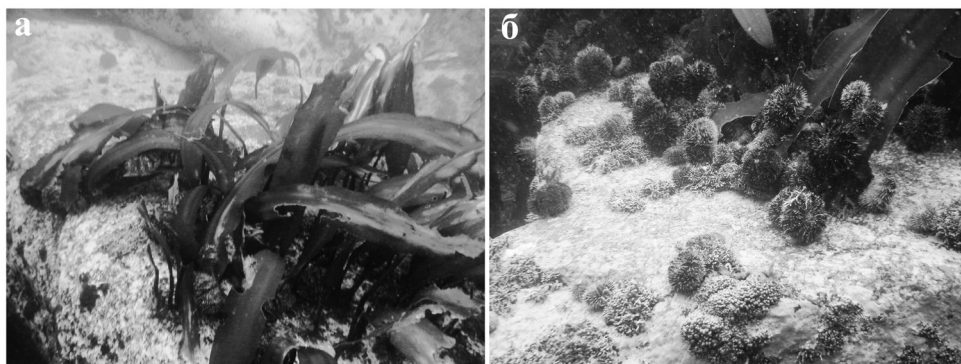


Рис. 1.17. Восстановленное поле ламинарии в северном Приморье (а).
Серый морской еж на восстановленном поле ламинарии (б)

Биотехнологии культивирования разрабатываются также и для других, не менее важных в промышленном отношении бурых водорослей - костарии и ламинарии цикориеподобной, позволяющие уже на первом году культивирования получать до 40—60 т костарии и на второй год культивирования до 80 т ламинарии цикориеподобной с одного гектара. Все эти мероприятия направлены на сохранение и увеличение запасов бурых водорослей, что должно обеспечить промышленность разносторонним сырьем для получения полезной продукции.

Глава 2. Фукоиданы и ферменты, катализирующие их превращения

Как известно, бурые водоросли морей Дальнего Востока России представляют собой богатый, легко возобновляемый источник уникальных по структуре и свойствам полисахаридов (ламинаранов, альгиновых кислот и фукоиданов). Полисахариды являются главным компонентом биомассы водорослей и выполняют ряд важнейших биологических функций: служат энергетическим резервом, участвуют в построении клеточных стенок, образуют наружные капсулы и межклеточный матрикс, препятствуют дегидратации, создают барьер для проникновения в клетку солей из морской воды или, напротив, обеспечивают избирательное поглощение катионов, необходимых для построения минерального скелета. Основное внимание в нашей работе будет уделено фукоиданам - биологически активным сульфатированным полисахаридам, которые синтезируются бурыми водорослями, и аналоги которых до сих пор не обнаружены в наземных организмах.

Фукоиданы в последние годы стали объектом повышенного внимания и интенсивного исследования. Они представляют собой обширный класс биополимеров, содержание и структура которых варьирует в зависимости от вида водоросли, мест ее произрастания, сезона сбора и многих других факторов. Постоянно растущий интерес к этим полисахаридам объясняется их низкой токсичностью и разнообразной биологической активностью, которая может быть использована при создании медицинских препаратов нового поколения. Биологическая активность этих полисахаридов в отличие от их структуры изучается чрезвычайно интенсивно. Трудности в установлении структуры фукоиданов обусловлены влиянием на их структурные характеристики самых разнообразных факторов как внешних, так и внутренних, связанных с источником выделения. В силу недостатка информации о структуре биологически активных фракций фукоиданов сведения о связи структура/активность для этих полисахаридов в настоящее время практически отсутствуют.

Гистохимически фукоиданы определяются как основной компонент внеклеточного матрикса (ВКМ) концептакулов фукоидов (McCully, 1968; Speransky et al., 2001). Концентрация этих полисахаридов в ВКМ концептакулов в несколько десятков раз выше, чем в межклетниках сердцевины (Speransky et al., 2001). Для определения локализации фукоидана было предложено использовать иммуноцитохимическую технику окрашивания. С помощью этого метода удалось обнаружить, что

фукоидан локализован в клеточных стенках. Однако он был обнаружен не только в эпидермальных клетках, но и во внутреннем кортикальном слое. Было показано, что в водоросли *S. japonica* фукоидан сосредоточен в основном на расстоянии 50–150 мкм от поверхности слоевищ (Mizuno et al., 2009). Предполагается, что фукоиданы, благодаря их гигроскопичности, помогают в высвобождении репродуктивных клеток. Фукоиданы предохраняют растения, произрастающие на литорали, от высыхания и обеспечивают стабильность клеточных стенок (Mabeau et al., 1990). Предположительно, благодаря своим антиоксидантным свойствам (Hu et al., 2001; Le Tutour et al., 1998; Xue et al., 2001) фукоиданы могут защищать растения в естественных условиях от оксидативного стресса, вызванного флуктуациями температуры, света, солености и др. Обсуждалась также экранирующая функция фукоидана против высоких интенсивностей света и ультрафиолетовой радиации (Holtkamp, 2009).

Этот полисахарид был впервые выделен из бурых водорослей более 100 лет назад шведским ученым Килин (Kylin, 1913) из университета г. Упсала, который назвал его фукоидином. Непременным и часто главным компонентом молекул фукоиданов служат остатки сульфатированной α -L-фукозы. В состав фукоиданов обычно входят и другие моносахариды: галактоза, манноза, ксилоза, уроновые кислоты, а также ацетильные группы. Родственные биополимеры обнаружены в некоторых морских беспозвоночных (морских ежах и голотуриях), принадлежащих к типу иглокожих (Berteau, 2003). Полисахариды животного происхождения содержат только фукозу и сульфатные группы, и, соответственно, представляют собой сульфатированные α -L-фуканы, построенные из повторяющихся тетрасахаридных блоков.

Содержание фукоиданов в бурых водорослях колеблется в довольно широких пределах: от 0,4 до 20,4% - и зависит от вида водоросли и сезона сбора. Самое высокое содержание фукоидана (20,4%) было обнаружено А.И. Усовым с соавторами в *Saundersella simplex*, принадлежащей к порядку Dicosiphonales (Усов et al., 2001). Достаточно высокое содержание фукоидана наблюдается в водорослях порядка Fucales: от 13,4% до 16,5% — у *Fucus vesiculosus* и от 10,0% до 11,5% — у *Ascophyllum nodosum* (Репина et al., 2004). В дальневосточных представителях порядка Laminariales содержание фукоидана меньше: от 0,6 до 6,5%, а водорослях порядка Fucales — от 1,5 до 7,9% (Имбс и др., 2009; Skriptsova et al., 2010). Такое различие в содержании фукоидана, предположительно, определяется сезонными изменениями абиотических факторов: температуры, концентрации элементов минерального питания, освещенности (Rioux et al., 2009), и зависит от репродуктивного статуса водоросли.

Фукоиданы, выделенные из одного вида водоросли, произрастающей в разных условиях, различаются не только моносахаридным составом, но и степенью сульфатирования. Известно, что фукоиданы из *Laminaria saccharina*, произрастающей в Баренцевом море, более сульфатированы и состоят из остатков фукозы и глюкуроновой кислоты, тогда как полисахариды беломорской популяции этой водоросли наряду с фукозой и глюкуроновой кислотой содержат глюкозу (Usov et al., 1998).

Фукоиданы хорошо растворяются в воде, поэтому их можно экстрагировать из водорослей водой (Zvyagintseva et al., 1999) или разбавленными кислотами (Hemmingson et al., 2006; Yoon et al., 2007) при комнатной температуре или небольшом нагревании. Для предотвращения экстрагирования альгинатов часто для экстракции используют 2% раствор хлорида кальция, который превращает содержащийся в водорослях альгинат в нерастворимую кальциевую соль (Bilan et al., 2002; Ponce et al., 2003). Для разрушения комплекса фукоидана с белком и облегчения экстракции полисахаридов иногда используются протеолитические ферменты (Rocha et al., 2005).

Бурые водоросли накапливают большое количество полифенольных соединений (до 14% от сухой массы водоросли (Ragan; Jensen, 1978)), которые, будучи прочно связанными с полисахаридами, уменьшают их растворимость в воде. Водоросли содержат и другие низкомолекулярные соединения, которые можно предварительно удалить обработкой биомассы органическими растворителями, например, смесью метанола, хлороформа и воды в соотношении 4:2:1. Такая смесь эффективно удаляет как полярные, так и неполярные вещества, но не растворяет полисахариды (Whyte; Southcott, 1970). Водные экстракты водорослей, как правило, содержат кроме фукоидана другие полисахариды: ламинаран, водорастворимые альгинаты, а также белки, полифенолы и прочие водорастворимые вещества. Фукоидан можно осадить из экстракта в виде нерастворимой соли с катионным детергентом — триметилцетиламмония бромидом (цетавлоном, цетримидом) (Bilan et al., 2002). Распространенным способом получения высокоочищенных фракций фукоиданов является ионообменная хроматография на различных анионообменных носителях (Chizhov et al., 1999). Новые анионообменные смолы, например, Macro Prep DEAE Support обладают большей емкостью и высокой разрешающей способностью по сравнению с традиционно используемыми ДЭАЭ-сефадексом и ДЭАЭ-целлюлозой. Более или менее гомогенные по отношению масса - заряд фракции иногда дополнительно очищают с помощью гель-фильтрации (Rocha et al., 2005). Процесс разделения контролируют, используя фенол-сернокислотный метод определения общих сахаров, можно также использовать окрашивание сульфатированных полисахаридов раствором толуидинового синего.

Структуру фукоиданов, так же, как и структуры других полисахаридов, устанавливают при помощи классических методов углеводной химии, с применением современных физико-химических методов. Обычно исследование структуры включает в себя несколько этапов:

1. Установление качественного и количественного состава моносахаридов, из которых построен полисахарид. Идентификация и количественное определение неуглеводных заместителей (composition analysis).

2. Определение размера цикла, конфигурации гликозидного центра для каждого моносахаридного остатка, положения углеводных и неуглеводных заместителей (linkage analysis).

3. Определение последовательности моносахаридных остатков, обнаружение истинной или замаскированной регулярности полимера (sequence analysis).

Для определения моносахаридного состава чаще всего используют идентификацию моносахаридов после кислотного гидролиза полисахарида методом ГЖХ, реже ВЭЖХ. С нашей точки зрения, предпочтительнее является метод ВЭЖХ, т.к. при идентификации моносахаридов методом ГЖХ приходится проводить дериватизацию, например, получать ацетаты полиолов, что увеличивает трудозатраты и время анализа. Абсолютные конфигурации можно установить с помощью ГЖХ. Для этой цели получают ацетилированные или триметилсилилированные гликозиды в результате реакции моносахаридов с оптически активными спиртами.

С целью получения более точной информации о структуре исследуемого полисахарида чаще всего используют методы ЯМР- и ИК-спектроскопии. К сожалению, методы масс-спектрометрии пока неприменимы для больших сульфатированных молекул фукоиданов, однако, этот метод с успехом используется для установления структуры олигосахаридов – структурных фрагментов фукоиданов. ИК-спектры дают информацию о присутствии в полисахаридах сульфатных групп, о чем свидетельствует широкая полоса поглощения при $1240\text{--}1260\text{ см}^{-1}$. Менее интенсивные полосы поглощения соответствуют сульфатам, находящимся в аксиальном (850 см^{-1}) или экваториальном (830 см^{-1}) положениях. Спектры ЯМР нативных фукоиданов обычно слишком сложны и поэтому менее информативны, чем спектры их производных. Для получения интерпретируемых ЯМР спектров проводят химические модификации полисахарида с целью упрощения его структуры. Наиболее часто используют сольволитическое десульфатирование и/или дезацетилирование. Для десульфатирования полисахарида в виде пиридиниевой соли нагревают в диметилсульфоксиде, иногда с небольшими добавками метанола, воды или пиридина. Ацетатные группы можно удалить обработкой водным

гидроксидом аммония при комнатной температуре (Chizhov et al., 1999).

Для определения типа связей между моносахаридами используют метод метилирования десульфатированных фукоиданов. Обычно применяют методику (Ciucano and Kerek, 1984), в соответствии с которой полисахарид, растворенный в диметилсульфоксиде, обрабатывают измельченным гидроксидом натрия и метилиодидом. Сравнение продуктов метилирования нативного и десульфатированного фукоиданов может дать сведения о расположении сульфатных групп. Для идентификации продуктов метилирования и определения их количественного соотношения используют ГЖХ-МС.

Применение периодатного окисления и, соответственно, деградации по Смитту, является неэффективным из-за большого количества в молекулах фукоиданов $1\rightarrow 3$ -связанных остатков фукозы и высокой степени замещения гидроксильных групп.

Структурные особенности фукоиданов – сульфатированных полисахаридов бурых водорослей и фукансульфатов иглокожих

История изучения структуры фукоиданов началась с исследования фукоидана, выделенного из бурой водоросли *F. vesiculosus*, которая относится к порядку Fucales. На протяжении долгого времени считалось, что углеводные цепи этого полисахарида содержат преимущественно остатки фукозы, соединенные $\alpha\text{-}1\rightarrow 2\text{-O}$ -гликозидными связями, сульфатированные по С4. Пересмотр этой структуры привел авторов статьи (Patankar et al., 1993) к выводу, что основная цепь полисахарида, выделенного из *F. vesiculosus*, содержит $\alpha\text{-}1\rightarrow 3$ -связанные остатки фукозы, а разветвления присоединены к ним в положении 2, тогда как сульфатные группы - в положении 4 в остатках фукозы. Родственные фукоиданам сульфатированные полисахариды, состоящие только из $\alpha\text{-L}$ -фукозы, выделены из иглокожих (Mulloy et al., 1994). В наземных организмах полисахариды, подобные фукоиданам, до сих пор не обнаружены.

В настоящее время сульфатированные фукозосодержащие полисахариды морских иглокожих и бурых водорослей условно можно разделить на несколько структурных групп:

1. Фуканы – полисахариды регулярной структуры, состоящие только из остатков фукозы и сульфатов. Выделены из иглокожих.

2. Фукоиданы, главная цепь которых состоит из остатков фукозы, связанных $\alpha\text{-}(1\rightarrow 3)$ -гликозидными связями. Выделены из бурых водорослей порядка Laminariales.

3. Фукоиданы, главная цепь которых состоит из остатков фукозы, связанных $\alpha\text{-}(1\rightarrow 3)$ - и $(1\rightarrow 4)$ -гликозидными связями. Выделены из

бурых водорослей порядка Fucales.

4. Сульфатированные галактофуканы — полисахариды, содержащие в главной цепи остатки фукозы и галактозы в качестве основных моносахаридов. Выделены из бурых водорослей сем. Sargassaceae.

5. Фукоиданы сложного состава — сульфатированные гетерополисахариды, содержащие остатки фукозы, маннозы, ксилозы, уроновой кислоты, галактозы и сульфат в различных соотношениях.

Сведения о химическом составе и структурных фрагментах отдельных представителей фукозосодержащих полисахаридов приведены в таблицах 2.1 и 2.2.

Фукансульфаты иглокожих

Фукансульфаты морских ежей *Arbacia lixula*, *Lytechinus variegates* и голотурии *Ludwigothurea grisea* построены из повторяющихся тетрасахаридных звеньев и, в отличие от фукоиданов, обладают четко выраженной регулярной линейной структурой, не содержат ацетатных групп и других моносахаридных остатков (табл. 2.1, 2.2).

Таблица 2.1

Структурные характеристики некоторых фукоиданов бурых водорослей

Бурая водоросль	Моносахаридный состав Fuc:Glc:Gal:Man:Xyl:Ram:GlcA	Количество сульфатов	Ссылка
<i>Laminariales</i> <i>Chorda filum</i>	*a) 1,0:0,01:0,02:0,01:0,01:0:0 *б) 1,0:0,05:0,01:0,1:0,04:0(**5,5) ♦*в) 1,0:0,6:0,07:0,1:0,15:0(**3,5)	**26,5 **13 **13	(Chizhov et al., 1999)
<i>Ecklonia kurome</i>	*a) 1,0:0:0,36:0,48:1,08:0:1,85 ♦*б) 1,0:00:0,81:0,18:0,45:0:0,61 *в) 1,0:0:0,03:0:0:0,03 *г) 1,0:0:0,19:0:0:0,07	*2,35 *2,0 *1,61 *1,48	(Nishino, Aizu et al., 1991; Nishino, Nagumo et al., 1991)
<i>Laminaria cichorioides</i>	**52:0,2:2,2:0,2:0,3:0,3,7 ♦**90:6:1,2:0:2,8:0:0	**44 **38	(Zvyagintseva et al., 2003; Усов, Кирьянов А.В., 1994)
<i>Laminaria japonica</i>	*1,0:0,07:0,37:0,09:0,14:0,02:0,21	*1,66	(Honya et al., 1999)

<i>Laminaria saccharina</i> (Белое море)	**a) 36,3:1,5:0:0:0:0:8,9 **б) 14:0,6:0:0:0:0:36,8 **в) 18,6:0,2:0:0:0:0:15,0	**37 **14,3 **23,8	(Усов и др., 1998)
<i>Laminaria saccharina</i> (Баренцево море)	**a) 34,8:0:0:0:0:0:9,6 **б) 20,2:0:0:0:0:0:19,7 **в) 18,0:0:0:0:0:0:13,6 ♦**г) 33,8:0:0:0:0:0:10,8	**40,0 **20,4 **25,8 **35,4	(Усов и др., 1998)
<i>Macrocystis purifera</i>	**36:0:2:0:1:0:0	Н.о.	(Schweiger, 1962)
<i>Undaria pinnatifida</i>	*a) 1,0:0:0,77:0,04:0,03:0:0,33 *б) 1,0:0:0,87:0,03:0,04:0:0,12 *в) 1,0:0:1,76:0,04:0,08:0,17	*0,32 *1,12 *3,37	(Mori et al., 1982)
<i>Undaria pinnatifida</i>	*1,0:0:1,1:0:0:0:0	*0,72	(Lee et al., 2004)
Fucales <i>Sargassum linifolium</i>	*2,5:0:8,4:1,0:2,5:0:4,6	**19	(Abdel-Fattah et al., 1974)
<i>Sargassum stenophyllum</i>	♦* 59,6:2,1:31,5:1,9:4,8:0:0 ♦*25,5:9,9:24,5:34,3:5,8:0:0	**28,5 **5,2	(Duarte et al., 2001)
<i>Ascophyllum nodosum</i>	**a) 49:0:0:0:10:0:11 *б) 1,1:0:1:0,1:0,1:0:0,2 *в) 8:0:1:0:0:0:0 **г) 25:0:0:0:26:0:27	**21 *0,8 н.о. **13	(Dillon et al., 1953; Larsen et al., 1970; Medcalf et al., 1978; Percival, 1968; Percival, 1971)
<i>Fucus vesiculosus</i>	*1,0:0:0,02:0,02:0:0:0	0,9	(Larsen et al., 1970)

<i>Fucus evanescens</i>	♦**а) 58,7:0:1,6:0:1,6:0:0:0 **б) 35,4:4:0:0,8:6,1:0:н.о **в) 10,7:1,1:3:3,7:17,4:0:15,6 **г) 33,2:0:4,5:3,5:8,1:0:28,9 **д) 34:0:5,4:0:3,8:0:32,5	**46,5 н.о **19,6 **28,9 **32,5	(Bilan et al., 2002)
<i>Pelvetia wrightii</i>	*10,0:0:1,0:0:0:0:0	Н.о.	(Anno et al., 1966)
Desmarestiales <i>Desmarestia aculeate</i>	*1,0:0:2,0:0:0,13:0:1,7	Н.о.	(Percival; Young, 1974)
Ectocarpales <i>Adenocystis utricularis</i>	♦* а) 74:1:22:2:С:0:0 ♦*б) 73:2:18:4:1:0:0	**30 **34	(Ponce et al., 2003)

* — мольные отношения

** — процентное содержание

н.о — не определено

♦ — для этой фракции получен ЯМР-спектр

С — следовые количества

Фукоиданы с главной цепью, состоящей из α -(1→3)-связанных остатков фукозы

Нужно отметить, что в большинстве случаев для установления структуры выбираются фракции фукоиданов, основным компонентом которых является фукоза. Фукоиданы, выделенные из бурых водорослей, принадлежащих к порядкам Chordariales и Laminariales (табл. 2.1), представлены полисахаридами, состоящими из α -1→3-связанных остатков фукозы. Подробно изучен фукоидан, выделенный из бурой водоросли *Chorda filum* (Chizhov et al., 1999). Авторам удалось полностью расшифровать ¹H ЯМР спектр его десульфатированного и дезацетилованного производного. Было показано, что главная цепь состоит из гексасахаридного повторяющегося звена, в котором на пять (1→3)-связанных остатков фукозы приходится один остаток фукозы в качестве разветвления при С2. Сульфатные группы в нативном фукоидане расположены преимущественно при С4, и реже — при С2. Некоторые 3-связанные остатки фукозы ацетилованы по положению 2.

Фукоидан из *Analipus japonicus* имеет такую же основную цепь, состоящую из (1→3)-связанных остатков фукозы, но содержит много-

численные заместители в виде единичных остатков α -L-фукопиранозы (три ответвления при С4 и одно при С2 на каждые 10 остатков фукозы главной цепи). Сульфатные группы располагаются, в основном, при С2 и реже при С4, тогда как ацетатные группы локализованы главным образом при С4. Большинство концевых невосстанавливающих остатков фукозы сульфатированы при С2 и С4 (Билан и др., 2007).

Фукоидан, выделенный из дальневосточной бурой водоросли *L. cichorioides*, также построен по общему для представителей порядка Laminariales плану: основная цепь содержит остатки фукозы, связанные α -(1→3) гликозидными связями. Эта водоросль синтезирует самый высоко сульфатированный фукоидан среди известных: практически все остатки фукозы в нем сульфатированы при С2 и С4 (Zvyagintseva et al., 2003).

Фукоиданы, основная цепь которых состоит из (1→3)- и (1→4)-связанных остатков α -L-фукозы

Основная цепь фукоиданов бурых водорослей порядка Fucales (Cyclosporoophyceae) построена из чередующихся α -1→3 и α -1→4-связанных остатков фукозы (табл. 2.1). Возможно, различия в структуре основной цепи фукоиданов связаны с разным механизмом биосинтеза этих полисахаридов бурыми водорослями, принадлежащими Phaeosporophyceae и Cyclosporoophyceae.

В работе М.И. Билан и др. было показано, что фракция фукоидана, выделенная из Тихоокеанской бурой водоросли *F. evanescens*, обладает линейной структурой и состоит из чередующихся остатков 1→3- и 1→4-связанной α -L-фукопиранозы, сульфатированной по С2. Небольшое количество дополнительных сульфатных групп расположено в положениях 3 и 4 остатков L-Fuc (Silchenko et al., 2013). Кроме того, в фукоидане часть остатков фукозы ацетилована (Bilan et al., 2002). Другими авторами (Kusaykin et al., 2006) из *F. evanescens* была выделена фракция фукоидана с более высоким содержанием α -1→3-связанных остатков L-фукозы (1→3 : 1→4 = 1,5:1). По всей видимости, бурая водоросль *F. evanescens* синтезирует разные типы фукоиданов.

Водоросль *Ascophyllum nodosum* также синтезирует несколько структурных типов сульфатированных полисахаридов. Фракцию, содержащую наибольшее количество сульфатных групп, изучали с помощью ЯМР спектроскопии. Перед проведением спектроскопических экспериментов выделенный фукоидан был подвергнут частичному кислотному гидролизу. Для выделенной фракции была предложена регулярная структура из повторяющихся дисахаридных звеньев (Chevolot et al., 2001). Из *Fucus distichus* удалось выделить фракцию фукоидана с необычно высокой

степенью регулярности (Bilan et al., 2004). Она имела повторяющиеся дисахаридные звенья, построенные из остатков α -L-фукозы, связанных 1→3- и 1→4 гликозидными связями.

Фукоиданы, представляющие собой сульфатированные галактофулканы или более сложные гетерополисахариды

Фукоиданы нередко являются сложными гетерополисахаридами и часто, кроме фукозы, содержат разные количества других моносахаридов. Известны полисахариды, состоящие примерно из равных количеств сульфатированных остатков фукозы и галактозы. Сульфатированные полисахариды, содержащие фукозу и галактозу в сравнимых количествах, принято считать галактофулканами. Галактофулканы были выделены из спорофиллов *A. fistulosa* (Усов, Смирнова, 2005), *U. pinnatifida* (Lee et al., 2004) и из целых талломов *L. japonica* (Xue et al., 2001), *L. gurjanovae* (Шевченко и др., 2007), *S. patens* (Zhu et al., 2003).

Сульфатированные галактофулканы, выделенные из *Laminaria gurjanovae* (Шевченко и др., 2007) и *Undaria pinnatifida* (Lee et al., 2004) (Табл. 2.1, 2.2), построены из (1→3)-связанной α -L-фукопиранозы с сульфатами при С2 и разветвлениями при С4, представленными остатками галактозы или остатками глюкуроновой кислоты при С4 галактозы. В фукоидане из *L. gurjanovae* некоторые остатки α -L-Фуc ацетилированы по гидроксильным группам при С2.

В работе Wang et al. (2010) было проведено разделение фукоидана из *S. japonica* на колонке с DEAE — сефарозой на три фракции (LF1, LF2, LF3). Основная фракция LF2 содержала в основном L-фукозу, D-галактозу и сульфатные группы в соотношении 6:1:9. С помощью одно- и двумерной ЯМР - спектроскопии было показано, что главная цепь построена из 1→3- и 1→4-связанных (75 и 25%, соответственно) остатков α -L-фукопиранозы. В точках разветвления 3 - связанных друг с другом остатков α -L-фукопиранозы к атомам С4 присоединены остатки β -D-галактопиранозы (35%) или фукозы (65%). Сульфатные группы расположены в положении 2 или 4, иногда 2 и 4 остатков фукозы и в положении 3 и/или 4 остатков галактозы.

Тип фукоиданов, представителем которого является ксилофукоглюкуронан, выделенный из бурой водоросли *Ascophyllum nodosum*, назван аскофилланом. Его основная цепь состоит из остатков D-глюкуроновой кислоты, соединенных 1→4-связями, к которым присоединены ксилоза и сульфатированные остатки L-фукозы и D-галактозы (Kloareg et al., 1986). Фукоиданы подобного строения были выделены из бурой водоросли *Desmarestia menstrualis* (Duarte et al., 2001). Для полисахарида аналогичного состава из *Pelvetia gymnospora* (Silva, 2005) предложена

структура с центральным кором, состоящим преимущественно из 1→3- и 1→4-связанных остатков β -D-глюкуроновой кислоты, замещенных по О-2 остатками α -L-фукозы и β -D-ксилозы.

Другой тип сульфатированных полисахаридов, который первоначально выделили из бурой водоросли *S. linifolium*, назван саргассаном. Такие полисахариды отличались от других фукозосодержащих полисахаридов высоким содержанием галактозы (Abdel-Fattah et al., 1974). Основная цепь молекулы саргассана состоит из остатков D-глюкуроновой кислоты и маннозы, а разветвления включают в себя D-галактозу, D-ксилозу и L-фукозу; сульфатные группы присоединены к некоторым остаткам галактозы и фукозы. Фукоидан саргассанового типа, не содержащий фукозы в составе кора, выделен из бурой водоросли *Hizikia fusiforme* (*S. fusiforme*) (Li et al., 2006). Его главная цепь состоит из чередующихся остатков 2-связанной α -D-маннопиранозы и 4-связанной β -D-глюкуроновой кислоты с небольшим количеством 4-связанной β -D-галактозы. Полисахарид с аналогичным глюкурономанновым кором был найден ранее в *Kjellmaniella crassifolia* (Sakai et al., 2003).

Тщательное фракционирование нативного фукоидана из *L. angustata* var. *longissima* привело к выделению небольшого количества сульфатированного галактана, содержащего лишь следы фукозы и глюкуроновой кислоты (Nishino, Takabe et al., 1994). Структурный анализ этого полисахарида показал, что он имеет линейную главную цепь →3)- β -D-Galp-(1→6)- β -D-Galp-(1→, большинство сульфатных групп занимает положения 6 в 3-связанных остатках галактозы, прочие сульфатные группы находятся при О-3 в 6-связанных остатках, а имеющиеся ответвления из остатков галактозы присоединены в положение 4 как тех, так и других остатков.

Таким образом, фукоиданы водорослей представлены широким набором различных по химической структуре сульфатированных полисахаридов. Кроме того, из одного вида водоросли может быть выделено несколько типов фукоиданов, например, из *A. nodosum* было выделено 3 типа фукоиданов. Один из них представлял собой ксилофукоглюкуронан (аскофиллановый тип). Его основная цепь состояла из остатков глюкуроновой кислоты, соединенных 1→4-гликозидными связями, гликозилированных сульфатированными остатками L-фукозы и D-ксилозы (Kloareg et al., 1986). Основная цепь другого фукоидана была построена из 1→3- и 1→4-связанных остатков фукопиранозы, сульфатированной по положению С2 и, частично, по С3 (сульфатированный фукан) (Chevolot et al., 2001). Dillon с соавторами (Dillon et al., 1953) получили из *A. nodosum* сульфатированный полисахарид, содержащий фукозу и галактозу в соотношении 8:1.

Из *Spatoglossum schroederi* были выделены два сложных сульфатированных

полисахарида (Leite et al., 1998). Один из них содержал фукозу, ксилозу, глюкуроновую кислоту и сульфат. Этот полимер имел кор из 1→3-связанных остатков β-D-глюкуроновой кислоты, несущих ответвления при О-4 в виде цепей из 1→3-связанных остатков α-L-фукозы (аскофиллановый тип). Второй полисахарид практически не содержал уроновых кислот и состоял из фукозы, ксилозы, галактозы и сульфата в мольном отношении 1,0:0,5:2,0:2,0. Его кор был образован главным образом 1→4-связанными остатками β-галактозы, частично сульфатированными по О-3 (фукогалактан). Из *A. utricularis* выделили сульфатированные полисахариды, имеющие разные типы структур: галактофукан и низкосульфатированный гетерогенный полисахарид аскофилланового типа (Ponce et al., 2003).

Два типа фукоиданов были выделены из ризоидов марикультурной *L. japonica* (Ozawa et al., 2006). Один представлял собой сульфатированный фукан, другой фукоидан, помимо фукозы, содержал галактозу и маннозу и значительное количество уроновых кислот. Структурное многообразие фукоиданов, по-видимому, определяется видовой принадлежностью водоросли. Но прослеживаются и некоторые закономерности для каждого порядка, например, в хордариевых обнаружены только сульфатированные фуканы, в ламинариевых они преобладают (Kloareg; Quatran, 1988).

Из бурой водоросли *Sargassum stenophyllum* были выделены две фракции фукоиданов, состоящие из фукозы и галактозы в качестве основных моносахаридов (Duarte et al., 2001). Одна из фракций содержала большое количество остатков глюкуроновой кислоты и мало сульфатных групп, в то время как другая характеризовалась небольшим содержанием глюкуроновой кислоты и значительным содержанием сульфатов. Исследование структуры фракций показало, что они имеют главную цепь, построенную из остатков 1→6-связанной β-D-Gal и/или 1→2-связанной β-D-Man с разветвлениями при С3 и/или С4 галактозы, представленными остатками α-L-Fuc и остатками α-D-GlcA при С4 галактозы.

Из другой бурой водоросли *Laminaria angustata* var. *longissima* в небольшом количестве была выделена фракция сульфатированного галактана, содержащего лишь следы фукозы и глюкуроновой кислоты (Nishino, Takabe et al., 1994). Структурные исследования позволили авторам сделать вывод, что основная цепь этого полисахарида может быть представлена следующим образом: →3)-β-D-Galp-(1→6)-β-D-Galp-(1→. Большинство сульфатных групп занимает положение 6 в 1→3-связанных остатках галактозы, сульфатные группы могут также быть расположены при С3 атомах в 6-связанных остатках галактозы. Разветвления в виде остатков фукозы присоединены по С4 остатков галактозы (Nishino, Takabe et al., 1994). Полисахаридная композиция фукоидана, выделенного из бурой водоросли *Saccharina latissima*

(ранее *Laminaria saccharina*) включает пять молекулярных структур (Bilan et al., 2010). Основной полисахаридный компонент — сульфатированный фукан, цепь которого состоит из 3-связанных α-L-фукопиранозных остатков сульфатированных по С4 и/или С2 и разветвленных по С2 α-L-фукопираноз. Кроме того, общая фракция фукоидана содержала три других типа сульфатированных полисахаридов: фукогалактан с основной цепью из 6-связанных β-D-галактопиранозных остатков, разветвленных в основном по С4 и содержащих терминальные остатки фукозы и галактозы, фукоглюкурономаннан с основной цепью из чередующихся 4-связанных остатков β-D-глюкопиранозилуроновои кислоты и 2-связанных α-D-маннопиранозных остатков с α-L-фукопиранозными остатками в качестве единичных разветвлений по С3 α-D-Man и фукоглюкуронон с основной цепью из 3-связанных остатков β-D-глюкопиранозилуроновои кислоты с α-L-фукопиранозными остатками в качестве единичных разветвлений по С4. Как результат, даже один вид водоросли может содержать разные количества сульфатированных полисахариды, отличающихся структурой молекул.

Таблица 2.2

Структурные характеристики отдельных фракций фукансульфатов и фукоиданов, выделенных из разных источников

	Химическая структура		
Иглокожие <i>Arbacia lixula</i> (Alves et al., 1997)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2)	
	[→4)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→]n		
<i>Lytechinus variegates</i> (Berteau; Mulloy, 2003)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2)
	[→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→]n		
		4) ↑ OSO ₃ ⁻	4) ↑ OSO ₃ ⁻

<i>Ludwigiothurea grisea</i> (Alves et al., 1997; Berteau; Mulloy, 2003; Ribeiro et al., 1994)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) [→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→]n 4) ↑ OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻ ↓ 2)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2)
<i>Strongylocentrotus pallidus</i> (Vilela-Silva et al., 2002)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) [→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→]n	OSO ₃ ⁻ ↓ 2)	OSO ₃ ⁻ ↓ 4)	OSO ₃ ⁻ ↓ 4)
Бурые водоросли	1 группа			
<i>Cladosiphon okamuranus</i> (Nagaoka et al., 1999; Sakai et al., 2003)	GlcA(1 ↓ 2) [→3)-α-L-Fucp (1→3)-α-L-Fucp (1→3)-α-L-Fucp (1→ 4) ↑ OSO ₃ ⁻			
<i>Chorda filum</i> (Chizhov et al., 1999)	α-L-Fucp-(1 ↓ 2) [→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→ 4 ↑ OSO ₃ ⁻	CH ₃ OCO ↓ 2 4 ↑ OSO ₃ ⁻	α-L-Fucp-(1 ↓ 2) 4 ↑ OSO ₃ ⁻	
<i>Laminaria cichorioides</i> (Zvyagintseva et al., 2003)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) [→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→ 4) ↑ OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) 4) ↑ OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) 4) ↑ OSO ₃ ⁻	

<i>L. sachharina</i> (Usov et al., 1998)	-O ₃ SO ↓ 2) [→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→ 4) ↑ OSO ₃ ⁻	α-L-Fucp (1 ↓ 2) 4) ↑ OSO ₃ ⁻		
	2 группа			
<i>Fucus distichus</i> (Bilan et al., 2004)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) [→3)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→ 4) ↑ OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) 4) ↑ OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) 4) ↑ OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) 4) ↑ OSO ₃ ⁻
<i>F. vesiculosus</i> (Patankar et al., 1993)	[→3)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→ 4) ↑ α-L-Fucp (1		2) ↑ OSO ₃ ⁻	
<i>F. evanescens</i> (Bilan et al., 2002)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) [→3)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→3)-α-L-Fucp-(1→4)-α-L-Fucp-(1→ 4) ↑ OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) 4) ↑ OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) 4) ↑ OSO ₃ ⁻	OSO ₃ ⁻ ↓ 2) 4) ↑ OSO ₃ ⁻
<i>F. serratus L</i> (Bilan et al., 2006)	[→3)-α-L-Fucp (1→4)-α-L-Fucp (1→3)-α-L-Fucp (1→4)-α-L-Fucp (1→ 4) ↑ 1)-α-L-Fucp (4→1)-α-L-Fucp (3→1)-α-L-Fucp 4)→	OSO ₃ ⁻ ↓ 2)	OSO ₃ ⁻ ↓ 2)	

	3 группа		
<i>Ecklonia kurome</i> (Nishino et al., 1991b)	(1- α -L-Fucp (3 \rightarrow 1)- α -L-Fucp-(3 \rightarrow OSO ₃ ⁻ ↓ 2) →3)- α -L-Fucp (1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp (1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp (1 \rightarrow (4) ↑ OSO ₃ ⁻		↓ 2 (4) ↑ 1)- β -D-Galp-(4 \rightarrow
<i>L. gurjanovae</i> (Shevchenko et al., 2007)	OSO ₃ ⁻ OCOCH ₃ OSO ₃ ⁻ ↓ ↓ ↓ 2) 2) 2) →3)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp(1 \rightarrow (4 (4 ↑ ↑ 1)- β -D-Galp-(4 \rightarrow 1)- β -D-Galp-(4 \rightarrow		
<i>Undaria pinatifida</i> (Lee et al., 2004)	SO ₃ ⁻ SO ₃ ⁻ SO ₃ ⁻ ↓ ↓ ↓ 2 4 2 →3)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow 3)- α -L-Fucp-(1 \rightarrow (4 (4 ↑ ↑ 1)- β -D-Galp-(4 \rightarrow 1)- β -D-Galp-(4 \rightarrow		

Ферменты, трансформирующие фукоиданы

В настоящее время информация о ферментативной трансформации фукоиданов, равно как и самих ферментах, принимающих в ней участие, чрезвычайно ограничена. Теоретически на фукоиданы может воздействовать достаточно большое количество ферментов разной специфичности: фуканазы, сульфатазы, галактаназы, маннаназы, ксиланазы, различные гликозидазы и т.д. Это могут быть как ферменты высоко специфичные к определенным структурным фрагментам субстрата, так и комплексы ферментов, которые могут совместно действовать на фукоиданы определенной структуры.

Несмотря на трудности, связанные с многообразием и сложностью структур фукоиданов, интерес к ферментам, катализирующим те или иные их превращения, постоянно растет. Он обусловлен возможностями использования ферментов в установлении структуры субстратов, для

получения более простых биологически активных фрагментов фукоиданов, более подходящих для создания БАД или лекарственных препаратов.

Фукоиданазы. Распространение фукоиданаз

Классификация фукоиданаз до сих пор отсутствует, так как самих ферментов выделено немного. По состоянию на 2011 год в базе данных BRENDA содержатся сведения о 19 источниках фукоиданаз. Для большинства источников показано, что они могут синтезировать ферменты, гидролизующие фукоидан из той или иной бурой водоросли, при этом сведения о структуре субстрата часто очень ограничены, либо вообще отсутствуют. Только из одного источника был получен гомогенный препарат фермента, для двух ферментов изучена специфичность (Colin et al., 2006, Kusaykin et al., 2006).

Учитывая структуру фукоиданов, имеющих основную цепь, построенную из остатков α -L-фукозы, связанных α -1 \rightarrow 3 или α -1 \rightarrow 4 связями, фукоиданаз может быть, по крайней мере, две. Первая должна катализировать гидролиз α -1 \rightarrow 3 гликозидных связей между остатками фукозы в молекулах фукоиданов, вторая - α -1 \rightarrow 4.

Фукоиданазы обнаружены в морских беспозвоночных и морских бактериях. В представителях наземной фауны и микроорганизмах фукоиданазы не найдены. Существует несколько публикаций, посвященных распространению фукоиданаз в морских бактериях — эпифитах бурых водорослей и ассоциантов голотурий (Бакунина и др., 2000) и морских беспозвоночных Японского моря (Кусайкин et al., 2003) (Табл. 2.3).

К настоящему времени фукоиданазы выделены из морских микроорганизмов (*Vibrio* sp. N-5 (Furukawa et al., 1992), *Flavobacterium* sp. SA-0082, *Fucoidanobacter marinus* SI-0098 (Sakai et al., 2002)), морских протеобактерий (*Pseudoalteromonas citrea* КММ 3296, КММ 3297, КММ 3298 (Бакунина и др., 2002)), морских беспозвоночных *Haliotis* sp. (Thanassi and Nakada, 1967), *Patinopecten yessoensis* (Kitamura et al., 1992) *Littorina kurila* (Кусайкин и др., 2003)), морского ежа *Strongylocentrotus nudus* (Sasaki et al., 1996). Ранее было отмечено присутствие фукоиданазы, наряду с другими O-гликозид гидролазами, в экстракте гепатопанкреаса морского моллюска *Littorina* sp. (Elyakova et al., 1968). Подобный комплекс ферментов был найден и в кристаллическом стебельке моллюска *Telescopium telescopium* (Alexander et al., 1979).

Таблица 2.3

**Распространение фукоиданаз среди морских бактерий
и беспозвоночных Японского моря**

Таксон	Общее количество образцов	Количество образцов, синтезирующих специфичные ферменты			Общее количество активных образцов
		LcF*	FeF**	LcF, FeF	
Бактерии					
<i>Acinetobacter</i>	1	1	0	0	1
<i>Alteromonas/ Pseudoalteromonas</i>	30	2	1	16	19
<i>Bacillus</i>	1	0	1	0	1
<i>Corineforms</i>	6	1	1	3	5
<i>Cytophaga/ Flexibacter</i>	14	3	0	5	8
<i>Flavobacterium</i>	20	5	0	8	13
<i>Micrococcus</i>	5	1	1	1	3
<i>Pseudomonas/ Halomonas</i>	6	1	0	5	6
<i>Vibrio</i>	6	1	0	2	3
Неидентифицированные	8	1	0	4	5
Всего	97	16	4	44	64
Беспозвоночные					
Cnidaria	1	0	1	0	1
Sipuncula	1	0	1	0	1
Arthropoda	4	1	1	2	4
Mollusca	15	0	4	9	13
Echinodermata	11	1	5	5	11
Chordata	1	0	0	1	1
Всего	33	2	12	17	31

*— фукоидан из *L. sichorioides*, сульфатированный 1→3-α-L-фукан** — фукоидан из *F. evanescens*, сульфатированный 1→3;1→4-α-L-фукан

Выделение и очистка фукоиданаз

Основные схемы очистки фукоиданаз из различных организмов представлены в табл. 2.4. Все известные схемы включают осаждение сульфатом аммония, ионообменную хроматографию, гель-фильтрацию и отличаются многостадийностью и использованием весьма чувствительных методов разделения белков, таких как изоэлектрофокусирование и хроматофокусирование. Несмотря на использование самых современных методов очистки ферментов, в большинстве работ авторы получили частично- или высокоочищенные препараты фукоиданаз. Сообщений о выделении гомогенных фукоиданаз, необходимых для установления структуры, практически нет, за исключением фукоиданаз из гепатопанкреаса *Patinopecten yessoensis* (Kitamura et al., 1992) и штамма бактерии *Vibrio* sp. N-5 (Furukawa et al., 1992), лишь для одной фукоиданазы, выделенной из бактерии *Flavobacteriaceae bacterium* SW5, была установлена аминокислотная последовательность (Colin et al., 2006).

Таблица 2.4

Схемы очистки фукоиданаз

Источник выделения, ссылка	Схема выделения	Субстрат
<i>Vibrio</i> sp. (Furukawa et al., 1992)	1. Экстракция 2. Сульфатное осаждение (60%) 3. Хроматография на DEAE-Toyopearl 650M 4. Гель-фильтрация на сефакриле S-300 HR 5. Хроматофокусирование	фукоиданы из <i>K. crassifolia</i> <i>Cladosiphon decipiens</i> Futomuzuku
<i>Flavobacterium</i> sp. SA-0082 (Pat. USA 6277616, 2001)	1. Экстракция 2. Сульфатное осаждение (90%) 3. Анионообменная хроматография на DEAE-сефарозе FF 4. Гидрофобная хроматография на фенил-сефарозе CL-4B 5. Гель-фильтрация на сефакриле S-200 или S-300 6. Гидрофобная хроматография на фенил-сефарозе HP	фукоидан из <i>K. crassifolia</i>

<i>Patinopecten yessoensis</i> (гепатопанкреас) (Kitamura et al., 1992)	1. Экстракция 2. Фракционирование сульфатом аммония 30%, 70% 3. Анионообменная хроматография на DEAE- Тоуорpearl 650 М 4. Изоэлектрофокусирование 5. Гель-фильтрация на сефакриле S- 300 HR	фукоидан из <i>Nematocystus decipiens</i>
<i>Strongylocetrotus nudus</i> (пищеварительная систе- ма) (Sasaki et al., 1996)	1. Экстракция 2. Сульфатное осаждение 3. Хроматография на DEAE-Тоуорpearl-650 М 4. Хроматография на сефарозе FF 5. Гель-фильтрация на сефакриле S-200	2-сульфо- α -L- фукопиранозил- (1 \rightarrow 2)-пириди- ламинид-фукоза
<i>Haliotis</i> sp. (гепатопанкреас) (Sasaki et al., 1996)	1. Экстракция 2. Сульфатное осаждение (30-70%) 3. Хроматография на КМ-сефадексе А-50	фукоидан из <i>Fucus gardneri</i>
<i>Littorina kurila</i> (гепатопанкреас) (Кусай- кин и др., 2003)	1. Экстракция 2. Сульфатное осаждение 3. Хроматография на DEAE-Тоуорpearl-650 М 4. Хроматография на сефарозе FF 5. Гель-фильтрация на сефакриле S-200	фукоидан из <i>F. evanescens</i>
<i>Pseudoalteromonas citrea</i> (Bakunina et al., 2002)	1. Экстракция 2. Сульфатное осаждение 3. Хроматография на DEAE-Тоуорpearl-650 М 4. Хроматография на сефарозе FF 5. Гель-фильтрация на сефакриле S-200	фукоидан из <i>F. evanescens</i>

Сведения о свойствах и специфичности фукоиданаз

Несмотря на интерес к фукоиданам, фукоиданазы остаются слабо изученными ферментами. В большинстве случаев для фукоиданаз определены лишь некоторые свойства: рН-оптимум, рН-стабильность, температурный оптимум, температурная стабильность, молекулярная масса, предположен тип действия и частично охарактеризованы продукты ферментативного гидролиза. Фукоиданазы, выделенные из различных источников, отличаются друг от друга своими физико-химическими

характеристиками и ферментативными свойствами (табл. 2.5). Их молекулярные массы варьируют в пределах от 39,5 кДа (Furukawa et al., 1992) до 460 кДа (Sakai et al., 2002). Изоэлектрические точки лежат как в кислой, так и в щелочной области рН. Фукоиданазы отличаются друг от друга также рН оптимумами действия. Для фермента из *S. nudus* он расположен при рН 3 (Sasaki et al., 1996), фермент из *Fucoidanobacter* sp. SA-0082 наиболее активен при рН 5-9. рН-Оптимумы активности фукоиданаз моллюсков расположены в интервале от рН 5,0 до 9,0 (Kitamura et al., 1992; Thanassi and Nakada, 1967). В целом, рН-оптимумы ферментов из беспозвоночных находятся в более кислой области по сравнению с оптимумами рН ферментов, выделенных из бактерий.

Установлено, что фукоиданазы морской бактерии *Vibrio* sp. N-5 и морского моллюска *Haliotis* sp. ингибируются ионами Ag⁺ и двухвалентных металлов (Hg²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺) (Furukawa et al., 1992; Thanassi and Nakada, 1967). ЭДТА, ионы Cu²⁺, Pb²⁺ не влияют на активность этих же ферментов, тогда как ионы Co²⁺, Mg²⁺ слабо активируют их активность.

Таблица 2.5

Физико-химические свойства фукоиданаз

Источник	Фермент, изоформа	Тип действия	Т-оптимум, °С	рН-Оптимум	рН-стабильность	pI	Mr, кДа
<i>Vibrio</i> sp. No.5	E1	экзо	38–45	6,0	4,0-9,0	5,80	39,5
	E2	экзо	38–45	6,0	4,0-9,0	5,75	68,0
	E3	экзо	38–45	7,5	4,0-9,0	7,65	68,0
' <i>Fucanobacter lyticus</i> ' SN-1009	E1	эндо	30–35	6,5–8,0	н.о.	н.о.	100,0

<i>Pseudoalteromonas citrea</i> КММ 3296, КММ 3297, КММ 3298	E1	эндо	н.о.	6,5–7,0	н.о.	н.о.	н.о.
<i>Mariniflexile fucanivorans</i> SW5	E1	эндо	20–25	7,5	н.о.	н.о.	105,0
<i>Patinopecten yessoensis</i>	E1	эндо	н.о.	n.d	н.о.	7,4	85,0
<i>Haliotis</i> sp. (гепатопанкреас)	E1	экзо	38	5,4	2,0–10,0	н.о.	100,0–200,0
<i>Littorina kurila</i>	E1 E2	эндо	н.о. н.о.	5,4 8,5	н.о. н.о.	н.о. н.о.	н.о. н.о.
<i>Strongylocentrotus nudus</i>	E1	экзо	45	3,0–4,0	2,0–5,0	н.о.	130,0

н.о. — не определено

Температурные оптимумы большинства известных фукоиданаз лежат в области 38–45°C. Молекулярные массы ферментов эндо типа действия ниже, чем у ферментов экзо типа, что характерно и для других групп О-гликозид гидролаз.

Исследование и сравнение специфичности фукоиданаз затруднено из-за отсутствия субстратов с установленной структурой, структурного разнообразия последних, а также из-за сложностей, связанных с выделением индивидуальных ферментов.

Известно, что продуктами действия фукоиданаз на фукоиданы являются сульфатированные фукоолигосахариды, точная структура которых чаще всего не была установлена (Furukawa et al., 1992;

Kitamura et al., 1992; Pat. USA 6207652, 2001, Pat. USA 6277616, 2001). Возможно, что все известные фукоиданазы различаются по специфичности, так как в качестве субстратов при их изучении использовались фукоиданы, выделенные из разных источников, структура и моносахаридный состав которых значительно различаются.

Более подробные данные о структуре олигосахаридов — продуктов действия фукоиданазы из *F. marinus* SI-0098 на фукоидан из *Kjellmaniella crassifolia*, приведены в работе (Pat. USA 6277616, 2001). Трисахаридные фрагменты — продукты, выделенные из инкубационной смеси, содержали галактозу, связанную α -1→3-гликозидной связью, *D*-маннозу, которая является точкой разветвления, имеющей в качестве заместителей *D*-глюкуроновую кислоту, связанную с маннозой β -1→2-гликозидной связью, и *L*-фукозу, связанную α -1→3-гликозидной связью. Выделен также пентасахарид, содержащий *D*-маннозу, связанную α -1→3-гликозидной связью с глюкуроновой кислотой, и ряд других олигосахаридов (Pat. USA 6277616, 2001). Почти все продукты ферментативной реакции имеют на невозстанавливаемом конце остатки 4-дезоксид-*L*-эритро-гекс-4-енопиранозилуруоновую кислоты, а на восстанавливаемом конце — маннозы или ее сульфатированных производных. Авторы предполагают, что в фукоидане из *K. crassifolia* присутствуют чередующиеся дисахаридные фрагменты, построенные из глюкуроновой кислоты и маннозы. Вполне вероятно, что в выделенном из *F. marinus* SI-0098 препарате фермента наряду с фукоиданазой присутствует лиаза, которая расщепляет О-гликозидные связи по механизму β -элиминирования. На это указывает присутствие среди продуктов реакции олигосахаридов, имеющих двойную связь в остатке глюкуроновой кислоты на невозстанавливаемом конце.

Интересно, что ферментный препарат из морской бактерии *F. marinus* SI-0098 катализирует расщепление других фукоиданов, выделенных из бурых водорослей сем. Laminarinaceae — *Undaria pinnatifida* и *Lessonia nigrescens* (Sakai et al., 2002).

В работе Furukawa (Furukawa et al., 1992) была предпринята попытка исследовать специфичность выделенных из штамма бактерии *Vibrio* sp.N-5 фукоиданаз. Показано, что выделенные фукоиданазы (Е-1, Е-2 и Е-3) с одинаково высокой скоростью расщепляли фукоидан из *K. crassifolia*, несколько хуже — фукоидан из *Cladosiphon decipiens*, а *Futomuzuku*-фукоидан вообще не подвергался действию фермента.

Специфичность действия фукоиданаз из морской протеобактерии *Pseudoalteromonas citrea* (штаммы КММ 3296, КММ 3297, КММ 3298) была исследована (Бакунина и др., 2002) при помощи фукоиданов из

Laminaria cichorioides и *F. evanescens*, различающихся структурными характеристиками (Табл. 2.2). Фукоидан из *L. cichorioides* (1→3-α-L-фукан) содержит в 2 раза больше сульфатных групп, чем фукоидан из *F. evanescens* (1→3;1→4-α-L-фукан). Фукоиданазы бактериальных штаммов КММ 3297 и КММ 3298 эффективнее катализировали расщепление фукоидана из *L. cichorioides*, тогда как ферменты штамма 3296 — фукоидана из *F. evanescens*. При действии фукоиданаз из этих источников образовывались высокосульфатированные продукты с молекулярной массой от 1 кДа до 3,5 кДа, заметного количества фукозы и дисахаридов не образовывалось. Авторы полагают, что исследуемые штаммы синтезируют фукоиданазы эндо-типа действия (Бакунина et al., 2002).

При действии щелочной фукоиданазы из *L. kurila* (рН 8,5) на фукоидан из *F. evanescens* (Кусайкин и др., 2003) выход низкомолекулярных сульфатированных продуктов ($12 \geq n \geq 2$) оказался в три раза выше, чем при действии на него кислой формы фукоиданазы. Это может быть связано с возможностью существования субстрата в протонированной и непротонированной формах. Под действием фукоиданазы при рН 5,4 из *L. kurila* на фукоидан из *L. cichorioides* образуется в 3 раза меньше низкомолекулярных сульфатированных продуктов ($12 \geq n \geq 2$), чем при гидролизе фукоидана из *F. evanescens* (Кусайкин и др., 2003). Это может быть обусловлено большей доступностью для фермента О-гликозидных связей в низкосульфатированном фукоидане из *F. evanescens* по сравнению с высокосульфатированным фукоиданом из *L. cichorioides*.

Для установления типа расщепляемой связи авторы (Kusaykin et al., 2006) выбрали продукты ферментативного расщепления фукоидана из *F. evanescens*, полученные под действием фукоиданазы штамма КММ 3296 и фукоиданазы из *L. kurila* при рН 8,5. Используемая в этой работе в качестве субстрата фракция фукоидана из *F. evanescens* отличалась от ранее описанной в работе Bilan (Bilan et al., 2002). По данным метилирования (Kusaykin et al., 2006) 1→3-связей в ней больше, чем 1→4- в 3,5 раза. В продуктах напротив, преобладали 1→4-связи. (1→3)-α-L-Фукан из *L. cichorioides* также в небольшой степени подвергался гидролизу обоими ферментами. Из этих экспериментов следует, что в фукоиданах оба исследуемых фермента катализируют гидролиз доступных 1→3-связей и соответственно, являются (1→3)-α-L-фуканазами.

При действии препарата фукоиданазы из морского моллюска *Littorina kurila* на фукоидан из бурой водоросли *Fucus distichus* происходило расщепление некоторого количества гликозидных связей субстрата, но ни фукоза, ни низшие олигосахариды не образовывались (Билан и др., 2005). Главным продуктом является полисахарид,

построенный из повторяющихся дисахаридных звеньев →3)-α-L-Fucp-(2,4-di-SO₃⁻)-(1→4)-α-L-Fucp-(2SO₃⁻)-(1→ и практически не отличающийся по структуре от исходного вещества. В качестве минорного компонента выделена полимерная фракция с углеводной цепью такого же строения, но содержащая сульфатные группы только в положениях 2 и ацетилированная по положениям 3 и 4 остатков фукозы. Вероятно, в этом случае ферментативный гидролиз фукоидана происходит только по гликозидным связям несульфатированных остатков фукозы, содержание которых в исходном полимере весьма невелико. Очевидно, что участки молекул исходного полисахарида, отклоняющиеся от его усредненной структуры, собраны в блоки, в которых сконцентрированы неполностью сульфатированные и ацетилированные повторяющиеся звенья.

В литературе имеются сведения о трансформации фукоидана под действием частично очищенного препарата фукоиданазы из гепатопанкреаса *Pecten maximus*. (Daniel et al., 1999). Исследуемый ферментный препарат катализировал деградацию фукоидана из *A. nodosum*. Авторы показали, что при действии фермента на фукоидан в качестве продукта реакции образуются фрагменты с молекулярной массой около 3 кДа. Моносахаридные остатки в этих фрагментах соединены α-(1→3)-связью, кроме того, имеется 1→4-связанная фукоза. Сульфатные группы присоединены по С2 и, возможно, по С4 положениям остатков фукозы. В исследованной фракции также содержатся несульфатированные (1→3)- и (1→4)-связанные остатки α-L-фукозы (Daniel et al., 1999). Авторы этой работы не делают заключений о типе гидролизуемой связи.

Таким образом, в настоящее время исследованы несколько фукоиданаз из различных источников, определены их физико-химические характеристики, для некоторых из них установлен тип действия и специфичность. Остается надеяться, что трудности, связанные с выделением, определением активности и экспрессией генов фукоиданаз со временем будут преодолены, фукоолигосахариды, полученные методом ферментативной трансформации нативных фукоиданов будут выделены, их структура и механизм действия расшифрованы.

Глава 3. Исследование структурных особенностей фукоиданов методом масс-спектрометрии

В ТИБОУ ДВО РАН для исследования структуры фукоиданов практически впервые были использованы современные масс-спектрометрические (МС) методы. В процессе разработки этих методов возникало много проблем, связанных как с химией фукоиданов, так и с техникой масс-спектрометрического анализа. Например, МС-анализ имеет ограничения по молекулярным массам веществ, поэтому для фукоиданов необходимо было разработать методы фрагментации, причем с учетом их структурных особенностей. Подбор условий получения спектров в каждом отдельном случае требовал индивидуального подхода. В результате применения масс-спектрометрии для исследования структуры фукоиданов была получена информация, либо хорошо согласующаяся с уже известными выводами, сделанными с помощью независимых методов, что показывает полную адекватность масс-спектрометрических методов, либо совершенно уникальная информация, которую классическими подходами получить невозможно. В перспективе методы масс-спектрометрии в сочетании с различными методами фрагментации, в том числе и ферментативными, могут значительно упростить установление структуры таких сложных полисахаридов, как фукоиданы. Поэтому мы сочли необходимым в монографии посвятить отдельную главу масс-спектрометрии.

Устройство масс-спектрометра

Масс-спектрометрия представляет собой современную фундаментальную и прикладную физико-химическую область науки. В её задачу входит получение знаний о составе веществ, их структуре, физико-химических свойствах, а также происходящих с ними процессах. Функционально масс-спектрометр состоит из четырех блоков — источника ионов, масс-анализатора, детектора и системы управления (рис. 3.1).



Рис. 3.1. Упрощенная схема масс-спектрометра

Источник ионов. Перевод некоторой части исследуемого вещества в ионизированное состояние в масс-спектрометрах производится с помощью ионных источников (за исключением случаев, когда вещество уже находится в ионизированном состоянии). В ионных источниках применяются различные способы ионизации образца, такие как электронный или ионный удары, фотоионизация, вакуумный искровой разряд, тлеющий импульсный разряд и др. В настоящее время наиболее распространены матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (МАЛДИ) и ионизация электрораспылением (ИЭР). Эти методы ионизации были специально разработаны для анализа нелетучих полярных соединений — пептидов/белков, поли- и олигосахаридов, а также многих других.

Масс-анализатор. Метод масс-спектрометрического анализа основан на разделении ионов исследуемого вещества по величинам отношения m/z (m — масса иона, z — его заряд) и измерении этих величин. Устройства для разделения пучков ионов называют анализаторами. В масс-спектрометрах оно осуществляется различными методами. Статический метод основывается на раздельном или совмещенном в пространстве воздействии на пучок ионов статических электрического и магнитного полей и реализуется в магнитно-секторных приборах. В таких приборах ионы, имеющие разные массы и заряд, при своем движении в зависимости от отношения m/z отклоняются на разный угол. В настоящее время эти приборы морально устарели. Динамический метод основан на том, что ионы, имеющие различные массы и заряды, двигаются в создаваемом четырьмя электродами переменном электрическом поле по спиральным траекториям разного радиуса, что реализуется в приборах с «квадрупольным» анализатором. В этих приборах ионы с определенным (заданным) отношением m/z сходятся к оси движения, в то время как траектории других ионов удаляются от нее. Еще один вариант динамического метода основывается на том, что ионы, обладающие одинаковой кинетической энергией, но разной массой, имеют разные скорости и поэтому проходят равные расстояния за разное время. Этот вариант реализуется в приборах с времяпролетным (TOF) анализатором (от англ. time-of-flight), которые получили наибольшее распространение и используются совместно с источниками ионов МАЛДИ и реже ИЭР.

Детектор. Определение концентраций веществ или изотопов в образце производится путем измерения ионных токов разделенных ионов. При этом в качестве детектора используются вторично-электронные умножители или микроканальные пластины. Результаты измерений представляются обычно в виде масс-спектра и/или в форме таблицы данных.

Современные методы масс-спектрометрии, применяемые для изучения олиго- и полисахаридов

Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением (ИЭР МС) начала стремительно развиваться с конца восьмидесятых годов прошлого столетия. Вместе с методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ МС), этот метод открыл новые возможности для изучения высокомолекулярных соединений всех типов, включая белки, нуклеотиды, природные и синтетические полимеры.

Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением (ИЭР МС)

Процесс, позволяющий перевести ионы из раствора в газовую фазу, в которой они могут быть легко подвергнуты масс-спектрометрическому анализу, имеет огромное значение, потому что практически половина химических и биохимических реакций протекают с участием ионов, находящихся в растворах. Таким процессом является электрораспыление.

Три особенности метода ИЭР отличают его от других методов ионизации: 1 — продуцирование большого количества многократно заряженных ионов соединений с большой молекулярной массой, которые можно регистрировать с помощью практически любых типов масс-анализаторов, поскольку, как уже было отмечено, масс-спектрометр измеряет отношение массы к заряду; 2 — исследуемые соединения должны вводиться в прибор в растворенном виде, что позволяет естественным образом сочетать ИЭР МС с хроматографическими приборами; 3 — «мягкость» процесса ионизации электрораспылением, что позволяет получить ионы лабильных и полярных соединений, сохранить в газовой фазе нековалентно связанные комплексы, существующие в растворе, и изучать третичные молекулярные конформации биополимеров.

Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением была впервые представлена общественности Джоном Фенном в 1984 году (Yamashita, Fenn, 1984). Однако, группой под руководством Л.Н. Галль (Институт аналитического приборостроения РАН) примерно в это же время была предложена альтернативная разработка метода экстракции ионов при атмосферном давлении (ЭРИАД) (Aleksandrov et al., 1984). Развитие метода ИЭР МС с 1984 года позволило показать его возможности как имеющего огромное значение в развитии новых биохимических приложений. В 2002 году Джону Фенну и Коичи Танаке была присуждена Нобелевская премия за развитие масс-спектрометрии в области белковой химии.

Схематическое представление процесса формирования заряженных капель представлено на рис. 3.2. Напряжение в 2—4 кВ прилагается к металлическому капилляру с внешним диаметром 0.2 мм и внутрен-

ним — 0.1 мм, расположенному на расстоянии 1—3 см от противоэлектрода. Противоэлектрод в ИЭР МС может быть пластиной с отверстием, ведущим в систему ввода образца масс-спектрометра. При включении источника высокого напряжения, электрическое поле на кончике электрода пронзает раствор и положительные, а также отрицательные ионы электролита в растворе начинают движение под действием поля до тех пор, пока распределение заряда не создаст противодействие наведенным полем.

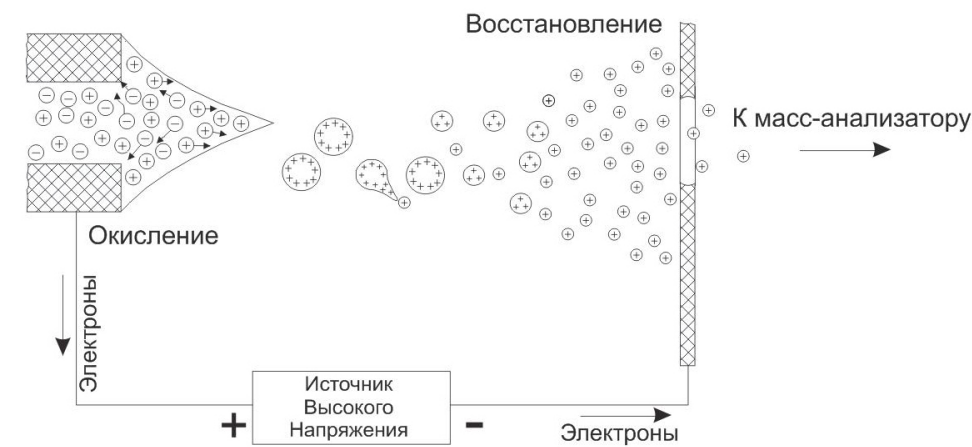


Рис. 3.2. Схематическое представление процесса формирования заряженных капель в источнике ИЭР

В итоге результирующее поле внутри жидкости будет равно нулю. Когда на капилляре присутствует положительное напряжение — катионы начнут движение в растворе вдоль поля, в сторону мениска жидкости, а анионы — в обратном направлении от мениска. Взаимное отталкивание положительных ионов на поверхности превосходит силу поверхностного натяжения жидкости, и поверхность начинает расширяться, позволяя положительным ионам и растворителю двигаться вдоль поля. Формируется конус, так называемый конус Тэйлора (Taylor, 1964), и, если приложенное поле достаточно сильное, тонкая струя срывается с кончика конуса и разбивается на множество заряженных капель. Они оказываются положительно заряженными благодаря избытку положительных ионов электролита на поверхности конуса и в струе. Таким образом, если, например, электролитом, присутствующим в растворе, является NaCl, то избыточными положительными ионами будут ионы Na^+ .

Масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (МАЛДИ МС)

Масс-спектрометрия МАЛДИ (от англ. MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) — десорбционный метод «мягкой» ионизации, обусловленной воздействием импульсов лазерного излучения на матрицу с анализируемым веществом (рис. 3.3). Матрица представляет собой химическое соединение, свойства которого позволяют снижать деструктивные свойства лазерного излучения и обеспечить ионизацию анализируемого вещества. МАЛДИ масс-спектрометрия находит широкое применение для анализа нелетучих высокомолекулярных соединений (пептиды, белки, углеводы, олигонуклеотиды, высокомолекулярные неорганические соединения, и другие синтетические и природные биополимеры).

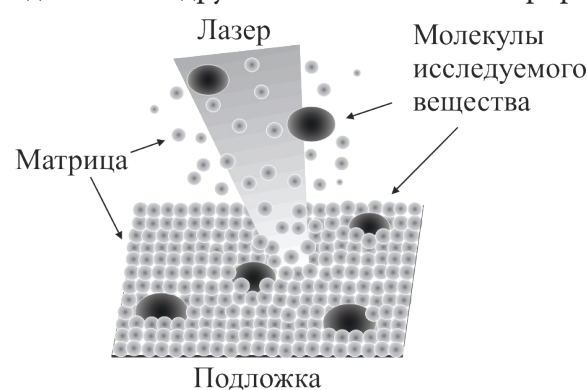


Рис. 3.3. Схематическое представление процесса МАЛДИ в ионном источнике масс-спектрометра

К достоинствам метода можно отнести низкое влияние избыточных количеств солей, буфера, детергентов и др. в образце на процесс образования ионов (Chen et al., 1998, Knochenmuss, 2002), а также формирование в основном однозарядных квазимолекулярных ионов исследуемых соединений. Последнее свойство метода дает возможность анализировать сложные смеси.

Метод МАЛДИ МС считается более чувствительным по сравнению с масс-спектрометрическими методами с другими способами ионизации. Благодаря тому, что число молекул матрицы значительно превосходит число молекул анализируемого вещества молекулы образца оказываются изолированными друг от друга, что препятствует кластеризации, снижающей вероятность формирования молекулярного иона образца. Матрица также минимизирует разрушение образца лазерными импульсами путем сорбирования большей части энергии и увеличивает эф-

Впервые возможность применения матрицы для подавления фрагментации при анализе нелетучих органических соединений на примере белков и пептидов была продемонстрирована в 1988 году Карасом и Хилленкампом (Hillenkamp, Karas, 1990, Karas, Hillenkamp, 1988). Ключевым моментом метода является использование матрицы, с помощью которой и происходит де-

фективность переноса энергии лазера к молекулам образца. С помощью времяпролетного МАЛДИ масс-спектрометра возможно детектирование фемтомольных количеств белков с молекулярными массами 300 и более кДа (Spengler, Cotter, 1990, Talrose et al, 1999).

Метод МАЛДИ МС был применен для анализа углеводов практически сразу же после первых сообщений его разработчиков об успешном анализе пептидов и белков с использованием Nd-YAG лазера (266 нм) и никотиновой кислоты в качестве матрицы (Karas et al., 1987). Стоит отметить, что эффективность ионизации нейтральных олигосахаридов методом МАЛДИ МС остается постоянной с увеличением размеров молекулы, в отличие от ИЭР МС, где эффективность ионизации уменьшается с увеличением молекулярной массы (Harvey, 1993). Однако, фосфорилированные, сульфатированные или содержащие сиаловую кислоту поли- и олигосахариды успешно анализируются методом ИЭР МС в режиме регистрации отрицательных ионов.

Необходимо отметить, что первые работы по применению масс-спектрометрии ИЭР (ЭРИАД, см. выше) для исследования реакционных смесей, содержащих олигосахариды (Александров и др., 1986), а также по изучению реакций, катализируемых карбогидразами (Безукладников и др., 1989), были проведены в ТИБОХ ДВО РАН, совместно с Институтом аналитического приборостроения РАН.

Тандемная масс-спектрометрия (МС/МС)

Тандемная масс-спектрометрия (сокращенно МС/МС) — любой масс-спектрометрический метод, использующий как минимум два этапа масс-анализа в совокупности как с процессами диссоциации, так и с химическими реакциями, вызывающими изменения в массе или заряде иона (Безукладников и др. 1988, Cooks et al., 1973, McLafferty, 1983).

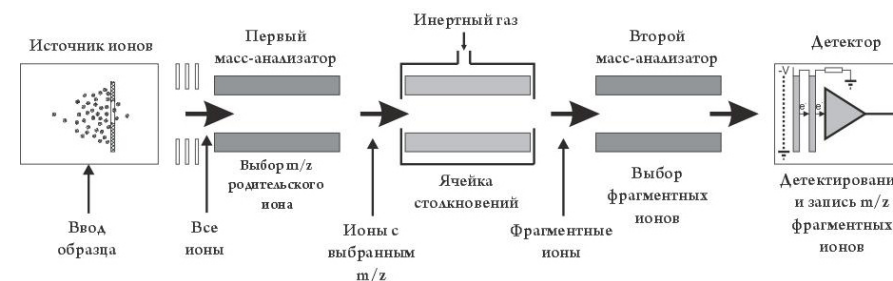


Рис. 3.4. Схема тандемного масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением

В самом общем случае, при проведении тандемного масс-анализа **первый** анализатор (рис. 3.4) используется для выделения иона-пред-

шественника («родительского» иона), который затем подвергается декомпозиции (спонтанно или путем активации, например, при соударении с нейтральными молекулами инертного газа) на фрагментные ионы и нейтральные фрагменты: $m_p^+ \rightarrow m_f^+ + m_n$

Второй масс-анализатор регистрирует образовавшиеся ионы-продукты. Существует возможность увеличения числа МС-шагов: выбрать первый ион, затем выбрать второй ион из полученных фрагментов, и, наконец, анализировать фрагменты последнего выбранного иона. Такая последовательность шагов называется МС/МС/МС или МС³. Число шагов может быть увеличено до получения МСⁿ-эксперимента, где n соответствует номеру поколения анализируемых ионов. Развитие tandemных масс-анализаторов для анализа биологических макромолекул дало возможность выбирать индивидуальный «родительский» ион и получать требуемую фрагментацию, устраняя тем самым необходимость выделения индивидуальных компонентов смеси в гомогенном состоянии. Развитие методов МАЛДИ МС и особенно ИЭР МС существенно расширило возможности tandemной масс-спектрометрии олиго- и полисахаридов.

Масс-спектрометрическая фрагментация как метод установления структурных особенностей исследуемых соединений

Технология получения фрагментных ионов, названная «диссоциацией, индуцированной столкновениями» или ДИС (от англ. collision-induced dissociation (CID), была применена к депротонированным, протонированным (или заряженным катионами щелочноземельных металлов) молекулам нативных олигосахаридов или их производных с использованием методов ИЭР (Duffin et al., 1992; Linsley et al., 1994, Phillips et al., 1993; Reinhold et al., 1995) и МАЛДИ МС (Cancilla et al., 1996; Perreault, Costello, 1994; Spengler et al., 1994). На фрагментацию олигосахаридов значительное влияние оказывает следующий набор факторов: метод ионизации, масс-анализатор, моносахаридный состав, тип связей, природа заместителей и др. Тем не менее, в процессе фрагментации наблюдается ограниченное число серий фрагментных ионов, что дает возможность их систематизировать.

Номенклатура, используемая для описания продуктов масс-спектрометрической фрагментации углеводов

Номенклатура, предложенная Домоном и Костелло (Domon, Costello, 1988), была разработана для описания различных фрагментов, получаемых при масс-спектрометрической фрагментации гликоконъюгатов, вне зависимости от метода их получения (рис. 3.5).

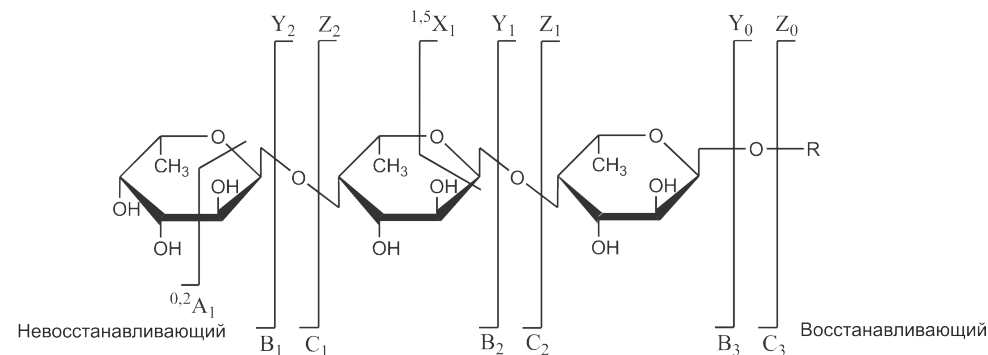


Рис. 3.5. Номенклатура, используемая для описания продуктов масс-спектрометрической фрагментации гликоконъюгатов, предложенная Домоном и Костелло

Ионы, сохраняющие заряд на агликоне (восстанавливаемом конце для олигосахаридов), обозначаются в случае разрыва моносахаридного кольца — X, при разрыве C1→O гликозидной связи — Y и при разрыве O→C_x гликозидной связи — Z. Ионы, сохраняющие заряд на невосстанавливаемом кольце, обозначаются A, B, C. Численные индексы справа внизу для X, Y, Z от 0 и далее обозначают порядок моносахаридных остатков, начиная от агликона (восстанавливающего конца). Численные индексы слева сверху обозначают место разрыва связей в моносахаридном кольце и начинаются с наименьшего по порядку атома углерода (или кислорода) из двух разрывающихся связей, начиная с 0 (рис. 3.5). Напротив, численные индексы для ионов A, B, C начинаются с цифры 1 и считаются с невосстанавливающего конца (терминального моносахарида). В случае соединений с разветвленной углеводной цепью, вводятся дополнительные индексы α, β и т.д., причем индексом α обозначается самая длинная углеводная цепь.

Масс-спектрометрическая фрагментация сульфатированных олигосахаридов в режиме регистрации отрицательных ионов

Как уже было отмечено, особенности метода ИЭР МС позволили обойти ограничения масс-спектрометрии МАЛДИ при анализе олигосахаридов, содержащих большое число кислотных остатков. В режиме регистрации отрицательных ионов практически не происходит отрыва лабильных кислотных групп, и формируются многозарядные ионы, дающие в режиме МС/МС наиболее интенсивные фрагментные ионы, отражающие информацию о типе связи, последовательности, разветвлениях и местах присоединения кислотных остатков и других заместителей. В связи с этим при изучении анионных поли- и олигосахаридов исполь-

зование tandemной ИЭР МС является предпочтительным.

Первая системная работа по изучению позиционных изомеров сульфатированной фукозы с помощью tandemной ИЭР масс-спектрометрии, совмещенной с капиллярным электрофорезом, была выполнена группой французских ученых. Тиссо с коллегами в 2006 году, взяв за основу предыдущие работы по изучению позиционных изомеров сульфатированных гексоз (Karlsson et al., 1996; Minamisawa, Hirabayashi, 2005), установили, что, на основании данных ИЭР МС/МС, полученных в режиме регистрации отрицательных ионов, возможно различить 2-О-, 3-О- и 4-О-сульфатированные изомеры фукозы (Tissot et al., 2006). Сульфатированная фукоза (в положениях С2 и С4) дает характеристичные $^{0,2}\text{X}$ - и $^{0,2}\text{A}$ -ионы, в то время как 3-О-сульфатированная фукоза дает только анион HSO_4^- в качестве основного продукта фрагментации. На основании данных компьютерного моделирования и МС/МС экспериментов был предложен механизм образования фрагментных ионов, представленный на рисунке 3.6.

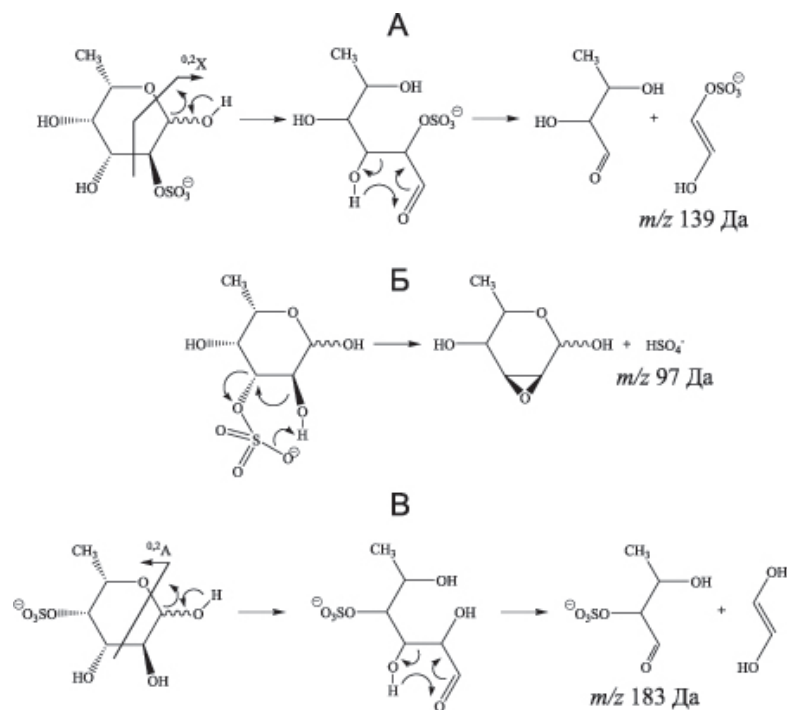


Рис. 3.6. Предполагаемые механизмы образования фрагментных ионов из сульфатированной фукозы в условиях ДИС МС/МС (режим регистрации отрицательных ионов). А, Б и В — схемы фрагментации 2-О-, 3-О- и 4-О-сульфатированной фукозы с образованием соответственно $^{0,2}\text{X}$ -иона с m/z 139 Да, эпоксида и аниона HSO_4^- с m/z 97 Да и $^{0,2}\text{A}$ -иона с m/z 183 Да

Предложенный механизм формирования $^{0,2}\text{X}$ - и $^{0,2}\text{A}$ -ионов включает разрыв связей между атомами С1 и О-5, ведущий к образованию открытой кето-формы с последующей перегруппировкой МакЛафферти (McLafferty F.W. et al., 1982), характеризуемой разрывом связи между атомами С2 и С3 пиранозного кольца фукозы (рис. 3.6., А и В).

Отсутствие $^{0,2}\text{X}$ - и $^{0,2}\text{A}$ -ионов при внутривольцевом разрыве для 3-О-сульфатированной фукозы показывает, что атом водорода при гидроксильной группе атома С3 играет ключевую роль в формировании $^{0,2}\text{X}$ - и $^{0,2}\text{A}$ -ионов в процессе фрагментации, что согласуется с более ранними исследованиями (Minamisawa, Hirabayashi, 2005; Carroll et al., 1995). Отсутствие $^{0,2}\text{X}$ - и $^{0,2}\text{A}$ -ионов также подтверждают исследования (1→3)-связанных сульфатированных дисахаридов, полученных из гепарина (Saad, Leary, 2004) и хондроитина (Desaire, Leary, 2000).

Таким образом, использование tandemной масс-спектрометрии в режиме регистрации отрицательных ионов позволяет определить последовательность моносахаридов в олигосахаридах. Установление типа связи и положения заместителей также доступно с помощью этого метода. Однако установить аномерную конфигурацию гликозидных связей и различить диастереоизомеры не всегда возможно без химической или химико-ферментативной модификации исследуемых объектов.

Применение масс-спектрометрии для исследования фукоиданов

Масс-спектрометрический анализ был применен нами для исследования фукоиданов, синтезируемых бурыми водорослями, обитающими в морях Дальнего Востока России.

Методы фрагментации фукоиданов

Структурные особенности сульфатированных полисахаридов, таких как хондроитинсульфаты, гепарины и каррагинаны, успешно исследуются современными МС-методами с МАЛДИ и ИЭР ионизацией.

Для МС-анализа необходимы методы фрагментации полисахаридов до олигосахаридов подходящих размеров, что достигается, в основном, благодаря наличию доступных ферментов, эффективно и специфично катализирующих расщепление сложных полисахаридных молекул (Harvey, 1999; Zaia, 2004). Для фрагментации сульфатированных полисахаридов используют также частичный кислотный гидролиз. Полученные олигосахариды, несущие информацию о строении исходного полимера, выделяют и анализируют. Например, Р. Даниель с коллегами использовали 0.75 мМ H_2SO_4 при 60°C для гидролиза фукоидана с последующим выделением олигосахаридов и анализом с помощью ИЭР МСⁿ (Daniel et al., 2007). Для

непосредственного анализа сложных реакционных смесей нами были применены как ИЭР МС, так и МАЛДИ МС, причем последний метод оказался более информативным, поскольку обладал низкой чувствительностью к нежелательным примесям и более высокой чувствительностью к полианионным компонентам в смесях за счет продуцирования только однозарядных ионов в источнике (Anastyuk et al., 2010).

Для фрагментации сульфатированных полисахаридов можно применять автогидролиз, представляющий собой, по сути, мягкий кислотный гидролиз с участием собственных сульфатных групп (находящихся в H^+ -форме) в качестве источника кислоты. При этом структура образующихся олигомеров может зависеть от положения сульфатных групп в исходном полисахариде. Так, при исследовании сульфатированного галактана из красной водоросли *Gigartina skottsbergii* с помощью ЯМР-спектроскопии и МАЛДИ МС был использован указанный способ получения олигосахаридов (Ciancia et al., 2005). Автогидролиз проводили при концентрации полисахарида 10 мг/мл 11 часов при 60°C. При автогидролизе каррагинанов расщеплялась гликозидная связь между остатками 2-О-сульфат-3,6-ангидро- α -D-галактозы и 4-О-сульфат- β -D-галактозы или 2,6-О-дисульфат- α -галактозы и 4-О-сульфат- β -галактозы (Ciancia et al., 1991; Nosedá, Cerezo, 1993; Stortz, Cerezo, 1987; Stortz, Cerezo, 1991). В процессе расщепления гликозидной связи наблюдалось отщепление сульфатной группы в положении С2. Гликозидные связи между остатками 3,6-ангидро- α -D-галактозы также расщеплялись, но с меньшей скоростью. Продукты фрагментации отдельного полисахарида, полученные автогидролизом и частичным кислотным гидролизом также могут различаться из-за различной чувствительности связей в условиях используемого метода.

Для сульфатированных полисахаридов широко применяется сольволиз как наиболее щадящий метод при необходимости их десульфатирования. Однако особенность структуры фукоиданов такова, что даже в условиях сольволитического десульфатирования происходит разрушение, как правило, большей части их молекул и выход подходящей для установления строения высокомолекулярной фракции (например, для метилирования) составляет от 7 до 40% (Bilan et al., 2002, Усов, Билан, 2009) от нативного полисахарида. Таким образом, теряется большая часть информации (часто до 90%) о строении фукоиданов. Нами впервые метод сольволиза был классифицирован как метод деградации фукоиданов и с помощью МС-методов для установления деталей структуры были проанализированы низкомолекулярные продукты, образующиеся при их сольволитическом расщеплении (Anastyuk et al., 2009, Шевченко и др., 2007).

*Анализ структуры фукоидана из бурой водоросли *Sacharina gurjanovae**

Современные методы масс-спектрометрии для исследования фукоиданов стали использоваться сравнительно недавно, возможно, потому, что последние представляли сложный объект для изучения. Сообщения об успешном масс-спектрометрическом исследовании фукоиданов появились всего несколько лет назад (в 2007 году) (Daniel et al., 2007; Шевченко и др., 2007).

Первая работа была выполнена в ТИБОХ ДВО РАН и посвящена структурным исследованиям фукоидана из бурой водоросли *S. gurjanovae* (Шевченко и др., 2007). Высокоочищенная фракция фукоидана **LgF2** была выделена из *S. gurjanovae* и состояла из остатков фукозы и галактозы с приблизительно равным соотношением: Fuc:Gal = 1:0,8. Для масс-спектрометрического исследования **LgF2** нами были использованы различные способы деполимеризации. Образец **LgF2** дезацетилювали, а затем десульфатировали и получили фракцию **LgF-DS**. При десульфатировании наряду с отщеплением сульфатных групп произошла деполимеризация исследуемого фукоидана. Состав образовавшихся при этом олигосахаридов, которые экстрагировали метанолом, анализировали методом МАЛДИ МС. При анализе масс-спектров были обнаружены сигналы ионов фукоолигосахаридов $[Fuc_n + Na]^+$ ($n=2-11$) в режиме регистрации положительных ионов (рис. 3.7) и $[Fuc_n SO_3]^-$ ($n=2-11$), а также моносульфат фукозы в режиме регистрации отрицательных ионов (рис. 3.8). Присутствие в спектрах сигналов, отстоящих от пиков фукоолигосахаридов на 16, 32, 48 Да, показывало наличие в смеси олигомеров ($[Fuc_n - Hex_m + Na]^+$; $n=4-6$, $m=1-3$ и $[Fuc_n - Hex_m SO_3]^-$; $n=3-6$, $m=1-2$), состоящих из остатков фукозы и гексозы, идентифицированной как галактоза.

Таким образом, анализ спектров продуктов сольволиза **LgF2** показал наличие фукоолигосахаридов со степенью полимеризации до 11 и смешанных олигосахаридов, содержащих в своем составе фукозу и галактозу (например, $Fuc_3 Gal_3$). Олигосахариды, содержащие уоновую кислоту, отсутствовали.

В МАЛДИ масс-спектрах продуктов частичного кислотного гидролиза (**LgF-H180**) дезацетилюванного образца фукоидана **LgF2** (см. рис. 3.9 А,Б) были обнаружены моносульфаты фукозы и галактозы и серия ионов вида $[Gal_n SO_3 Na + Na]^+$ ($n=2-3$); $[Gal_n + Na]^+$ ($n=2-5$) и $[Gal_n SO_3]^-$ ($n=2-3$), полученных в соответствующих режимах регистрации и принадлежащих сульфатированным галактоолигосахаридам со степенью полимеризации от 2 до 5. Сигналы, соответствующие фуко- и смешанным фукогалактоолигосахаридам, отсутствовали. Очевидно, фрагменты молекул полисахарида, построенные из остатков фукозы, в условиях кислотного гидролиза разрушаются.

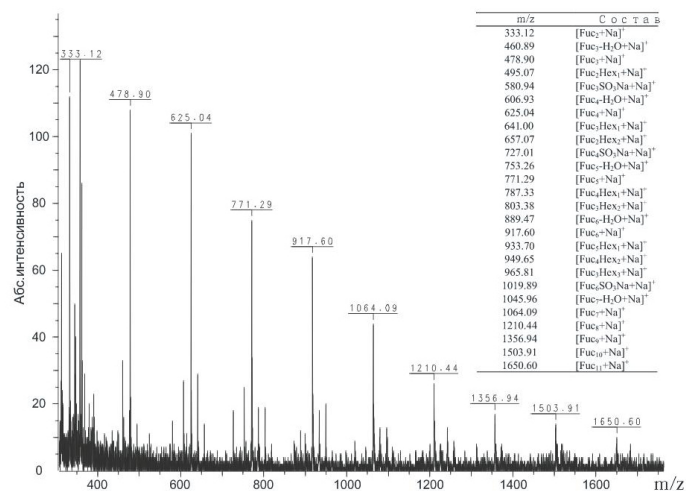


Рис. 3.7. МАЛДИ масс-спектр положительных ионов низкомолекулярных продуктов, образовавшихся при сольволитическом десульфатировании дезацетилированного фукоидана LgF2 из *S. gurjanovae*

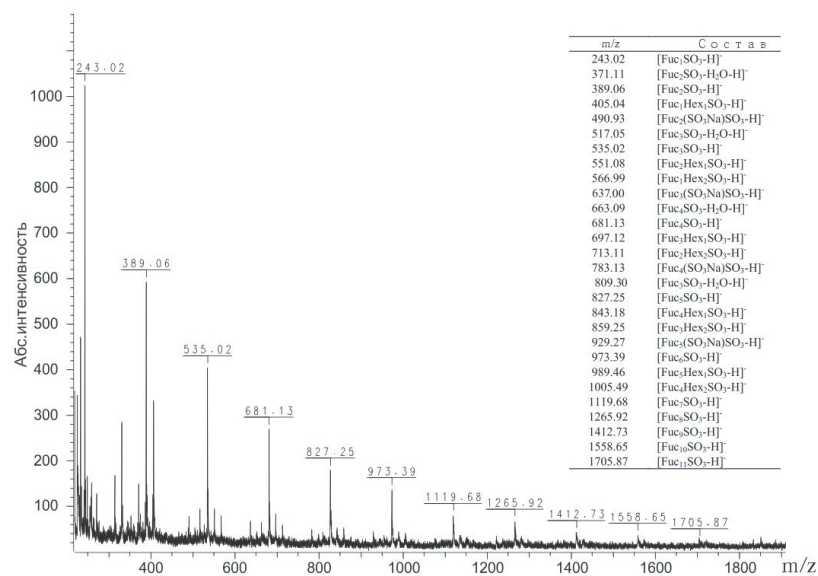


Рис. 3.8. МАЛДИ масс-спектр отрицательных ионов низкомолекулярных продуктов, образовавшихся при сольволитическом десульфатировании дезацетилированного фукоидана LgF2 из *S. gurjanovae*

Анализ методом МАЛДИ масс-спектрометрии продуктов расщепления фукоидана LgF2 из *S. gurjanovae*, образовавшихся в процессе сольволитического десульфатирования и частичного кислотного гидро-

лиза, позволяет сделать вывод, что фукоидан из *S. gurjanovae* является сульфатированным галактофуканом, построенном из блоков, состоящих из фукозы и галактозы. Кроме того, из данных МАЛДИ МС следует, что в условиях сольволиза разрушаются предпочтительно фрагменты полисахарида, построенные из остатков галактозы, а при частичном кислотном гидролизе – из остатков фукозы.

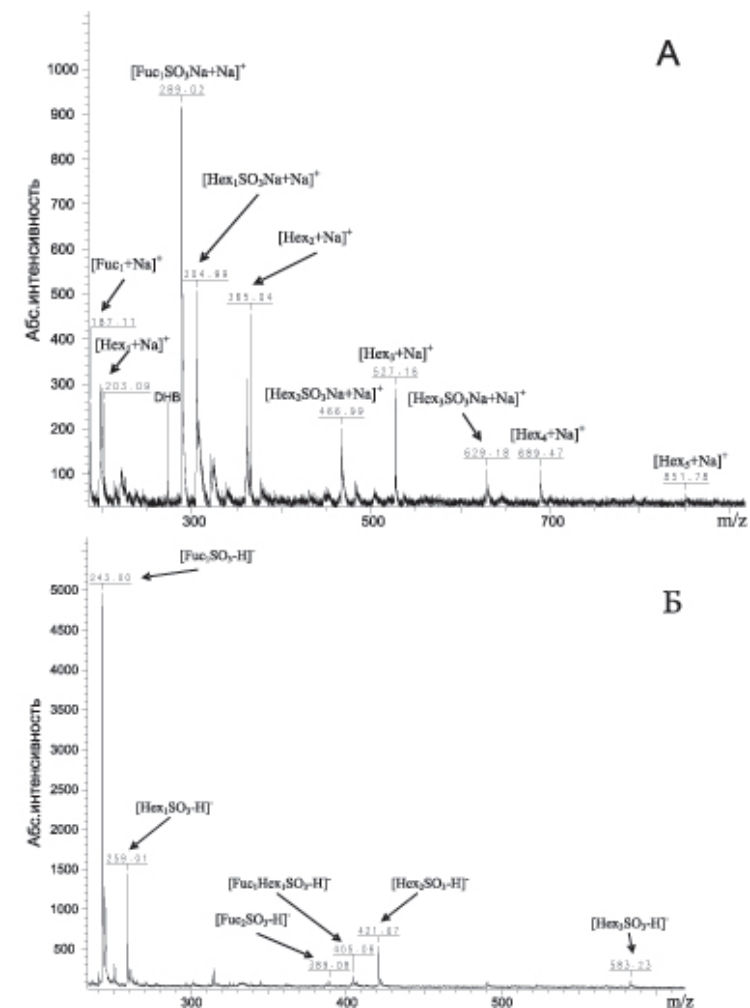


Рис. 3.9. МАЛДИ масс-спектр положительных ионов (А) и отрицательных ионов (Б) продуктов частичного гидролиза дезацетилированного фукоидана LgF2 из *S. gurjanovae* (0,2Н ТФУ, 3 часа, 100° С)

Исследование структуры фукоидана из *Saccharina cichorioides*

Литературная информация о строении фукоидана из *S. cichorioides* (прежнее название *Laminaria cichorioides*) противоречива. Первой группой исследователей было показано, что исследуемый фукоидан представляет собой практически полностью сульфатированный 1→3- α -L-фукан, остатки L-фукозы в котором 2,4-О-дисульфатированы (Zvyagintseva et al., 2003), причем строение основной цепи полисахарида характерно для отряда Laminariales (Phaeosporophyceae) (Cumashi et al., 2007). Согласно данным другой группы исследователей, фукоидан из *S. cichorioides* представляет собой галактофукан (Fuc:Gal~2:1), остатки L-фукозы в котором связаны α -(1→4)-гликозидной связью и сульфатированы в положениях при C2 и C3 (Yoon et al., 2007). Можно отметить, что существенное содержание галактозы наблюдалось в фукоиданах из водорослей *S. japonica* (Zvyagintseva et al., 2003), *S. gurjanovae* (Шевченко и др., 2007) и *U. pinnatifida* (Lee et al., 2004) также относящихся к отряду Laminariales. При исследовании фукоидана обеими группами исследователей применялись одни и те же методы: десульфатирование и метилирование с последующим анализом производных фукоидана с помощью ЯМР-спектроскопии.

Для анализа фукоидана, выделенного по методу (Zvyagintseva et al., 2003) из *S. cichorioides*, собранной в шельфовой зоне российского побережья Японского моря, мы применили два метода масс-спектрометрии – тандемный ИЭР МС в режиме столкновительной диссоциации, который положительно зарекомендовал себя при анализе фукоолигосахаридов из *A. nodosum* и *F. evanescens* и тандемный МАЛДИ МС, которым ранее не анализировали сульфатированные фукоолигосахариды в режиме МС/МС отрицательных ионов (точнее режим называется potential lift TOF/TOF, где вторичные ионы образуются при скачкообразном подъеме ускоряющего напряжения и регистрируются вторым времяпролетным анализатором). Использование МАЛДИ МС для полианионных олигосахаридов сопряжено с определенными трудностями, поскольку сульфатные группы очень лабильны и могут отрываться в источнике ионов. Нами было найдено, что использование фенилозона D-эритро-пентозы (arabinoosazone в оригинальной статье (Chen et al., 1997)) в качестве матрицы позволяет минимизировать фрагментацию.

Образец высокосульфатированного фукоидана LcF2 (Fuc, 98%, Man, 2%), выделенный по методике (Zvyagintseva et al., 2003), был подвергнут автогидролизу. Этанольный экстракт продуктов автогидролиза Lc-AHL (выход 66% от образца LcF2) был проанализирован с помощью масс-спектрометрии ИЭР (рис. 3.10) и МАЛДИ (рис. 3.11) в режиме регистрации отрицательных ионов.

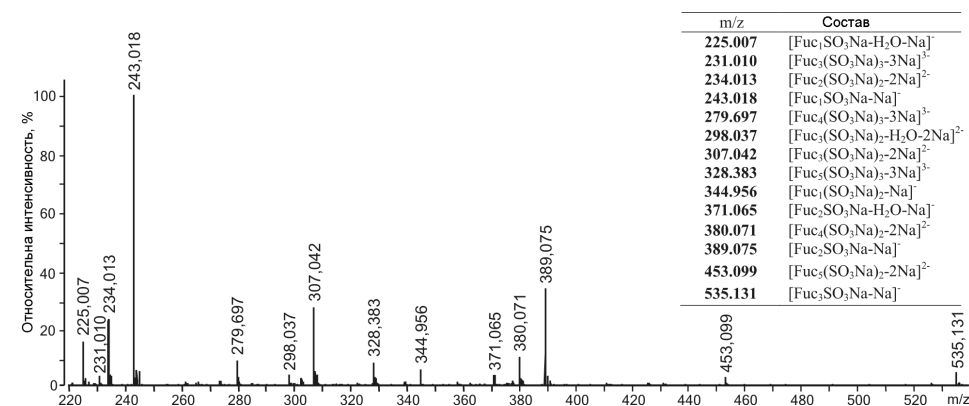


Рис. 3.10. ИЭР масс-спектр отрицательных ионов олигосахаридов, полученных автогидролизом фукоидана из бурой водоросли *S. cichorioides*

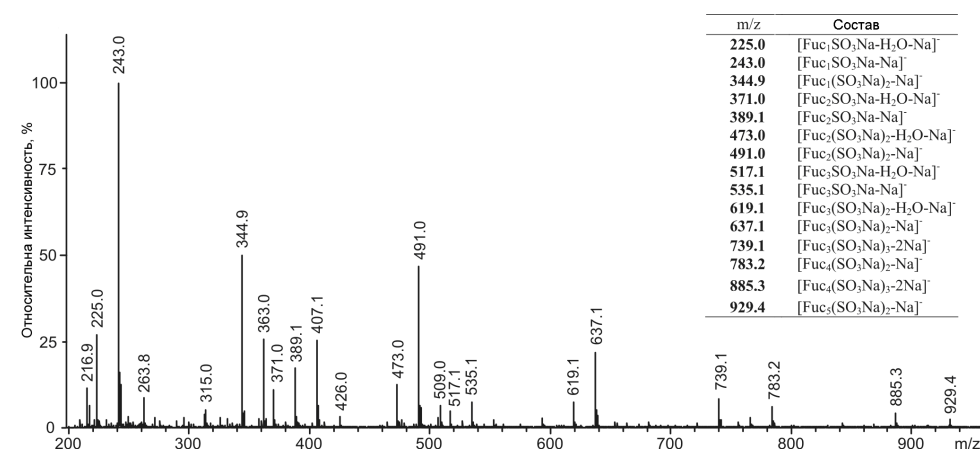


Рис. 3.11. МАЛДИ масс-спектр отрицательных ионов олигосахаридов, полученных автогидролизом фукоидана из бурой водоросли *S. cichorioides*

Анализ масс-спектров, полученных двумя методами, дал следующий состав смеси: моносульфат и дисульфат фукозы с m/z 243.0 и 344.9 (основные компоненты) и набор олигосахаридов со степенью полимеризации 2–5 и числом сульфатов на молекулу до 3. Стоит отметить, что интенсивность сигнала иона дисульфатированной фукозы с m/z 344.9 была выше при регистрации состава смеси методом МАЛДИ МС.

Далее были получены тандемные масс-спектры большинства ионов, находящихся в смеси. Для того, чтобы идентифицировать фрагментные ионы, имеющие одинаковое значение m/z , но возникающие из восстанавливающего либо невосстанавливающего концов молекулы, образец был восстановлен NaBD₄. В результате, ионы, сохраняющие заряд на

восстанавливающим конце (Y-ионы), имели на 3 Да большую массу и были идентифицированы однозначно. Полученные данные совпали с результатами исследований фрагментации олигосахаридов каррагинана с помощью ИЭР МС/МС, где было четко показано, что наличие сульфатной группы в остатке сахара провоцировало образование соответствующих Y-ионов, в то время как B- и C-ионы могли образовываться при разрыве гликозидных связей также и между несulfатированными остатками сахаров (Yu et al., 2006). В тандемных масс-спектрах олигосахаридов из *S. cichorioides* C-ионы практически не наблюдались.

На рисунках 3.12 и 3.13 показаны наиболее информативные тандемные масс-спектры дисульфатированной фукобиозы, полученные разными масс-спектрометрическими методами. Тандемный масс-спектр ИЭР (рис. 3.12) двухзарядного иона $[\text{Fuc}_2(\text{SO}_3\text{Na})_2-2\text{Na}]^{2-}$ с m/z 234.011 содержал интенсивные сигналы ионов с B_1 с m/z 225.007 и Y_1 с m/z 243.017 формирующихся при разрыве гликозидных связей. Та же картина повторилась и в тандемном МАЛДИ масс-спектре (рис. 3.13), где интенсивности указанных сигналов примерно совпадали. Отсюда следует, что сульфатные группы находились в среднем по одной на восстанавливаемом и на невосстанавливаемом остатках фукозы. Сигналы $^{0,2}X_0/^{0,2}A_0$, имеющие высокие интенсивности в ИЭР МС/МС спектрах фукоолигосахаридов из *A. nodosum*, содержащих большой процент (1→4)-связанных остатков фукозы, в данных масс-спектрах имеют гораздо меньшие интенсивности, особенно полученных с помощью МАЛДИ МС/МС.

На положение сульфатных групп в остатках фукозы на невосстанавливаемом конце дисахарида указывают сигналы $^{0,2}A_1$ (сульфат при C4), а также группа сигналов $^{0,3}X_1$. По всей видимости, интенсивность сигнала $^{0,2}X_1$ зависит от наличия сульфатной группы в положении C2 и она тем меньше, чем выше вероятность сульфатирования при C2, поскольку интенсивности ионов такого типа были высоки в тандемных ИЭР масс-спектрах несulfатированных олигосахаридов (Zhang et al., 2006) с остатком урсоевой кислоты на восстанавливаемом конце. Для более протяженных молекул общая картина сохранялась – остатки фукозы были связаны преимущественно (1→3)-связью и сульфатированы в положениях C2 или C2/C4.

Таким образом, в условиях автогидролиза были получены мультисульфатированные моно- и олигосахариды, не образующиеся в продуктах деградации с использованием сольволитического десульфатирования. Особенностью тандемных масс-спектров фрагментов фукоидана из *S. cichorioides* было отсутствие или сверхнизкая интенсивность фрагментных ионов $^{0,2}A/^{0,2}X$, возникающих в случае наличия в смеси структур,

содержащих в цепи (1→4)-связанные остатки фукозы, как в случае с фукоиданом из *A. nodosum* (Daniel et al., 2007). Из вышесказанного следует, что исследуемые фрагменты содержали 2- и реже 4-сульфатированные (1→3)-связанные остатки фукозы в качестве преобладающей

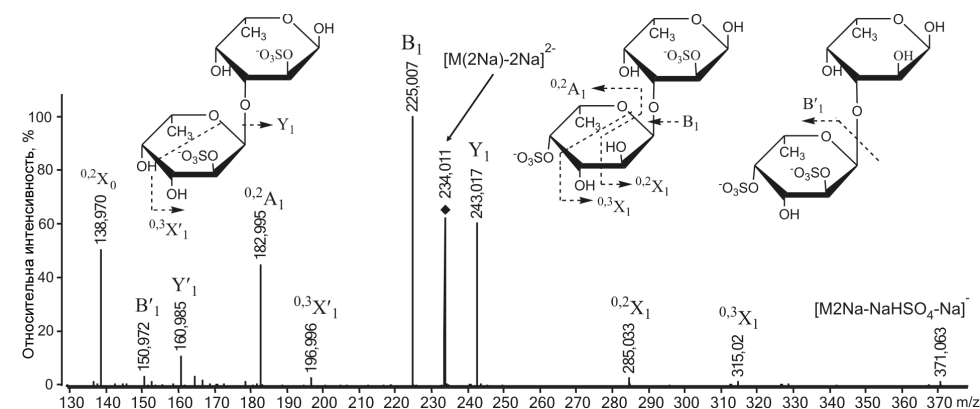


Рис. 3.12. Тандемный ИЭР масс-спектр иона $[\text{Fuc}_2(\text{SO}_3\text{Na})_2-2\text{Na}]^{2-}$ с m/z 234.011

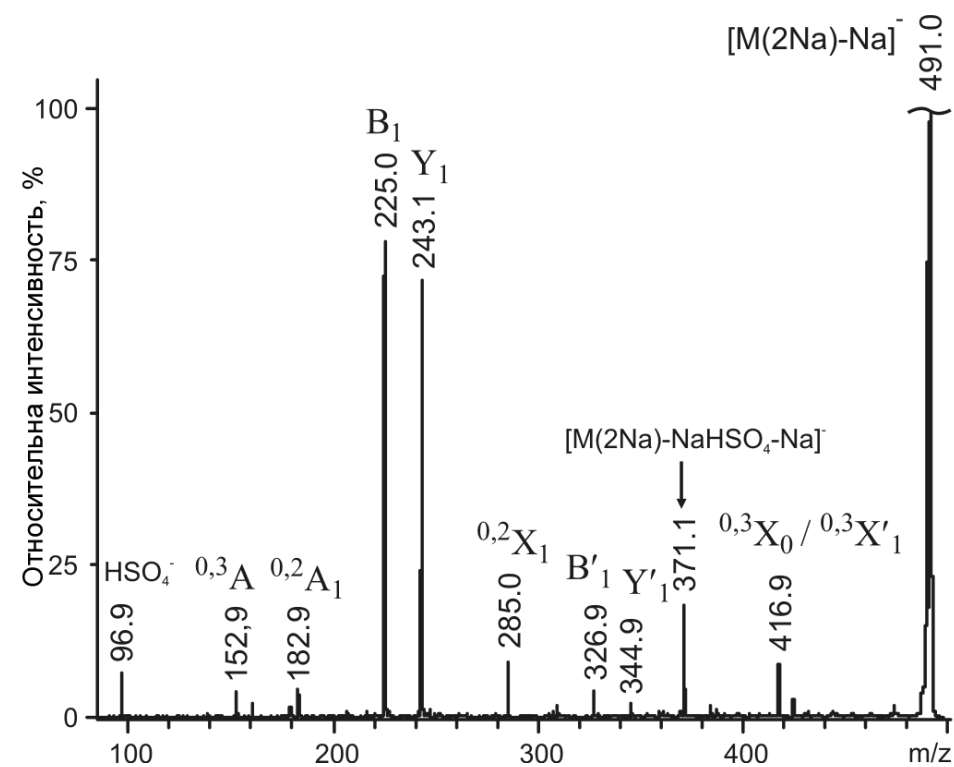


Рис. 3.13. Тандемный МАЛДИ масс-спектр иона $[\text{Fuc}_2(\text{SO}_3\text{Na})_2-\text{Na}]^{-}$ с m/z 491.0

структурной единицы. Сигнал фрагментного иона, характерный для С3 сульфатирования, в МС/МС спектрах моно- и дисульфатированной фукозы отсутствовал (Daniel et al., 2007). Применение тандемной МАЛДИ МС (а это было сделано впервые для таких образцов) для анализа смеси мультисульфатированных олигосахаридов с использованием специально подобранной матрицы (арабиноозазона) с целью уменьшения фрагментации образца в источнике ионов, по сравнению с ИЭР МС показало повышенную чувствительность к таким компонентам. Полученные данные согласуются с результатами исследований, выполненных ранее в ТИБОХ ДВО РАН (Zvyagintseva et al., 2003). Положение минорных включений остатков гексозы в структуре фукоидана из *S. cichorioides* остается невыясненным, поскольку в режиме отрицательных ионов гексозосодержащих олигосахаридов зарегистрировано не было.

Исследование структуры фукоидана из *Fucus evanescens*

С помощью методов углеводной химии и ЯМР-спектроскопии М. Билан с соавторами было показано, что основная цепь фукоидана из *F. evanescens* представляет собой линейный полимер, построенный из сульфатированных в основном при С-2 и частично ацетилированных остатков α -L-Фукозы, соединенных чередующимися (1→3)- и (1→4)-гликозидными связями (Bilan et al., 2002). При этом была установлена структура только основной цепи фукоидана. Кусайкин с соавторами выделили из *F. evanescens* фракцию фукоидана, содержащую приблизительно в 3.5 раза больше (1→3)-связанных остатков фукозы, чем (1→4)-связанных (Kusaykin et al., 2006). В обеих работах представлены данные моносакхаридного состава фукоидана, содержащего помимо фукозы, минорные компоненты — ксилозу, маннозу и галактозу. При этом положение этих минорных компонентов в структуре фукоидана не было установлено. В нашей работе (Anastyuk et al., 2009) мы показали, что, используя тандемную масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением (ИЭР МС/МС), возможно установить структурные особенности не только сульфатированных фукоолигосахаридов, но и смешанных олигосахаридов, содержащих минорные моносакхариды, что не всегда доступно методам ЯМР-спектроскопии.

Исследуемый нами образец фукоидана из *F. evanescens* (**FeF2**) был выделен по методу, описанному в работе (Kusaykin et al., 2006). В условиях сольволитического десульфатирования этого фукоидана помимо полимерной фракции был получен набор олигосахаридов, как в случае с фукоиданом из *L. gurjanovae*. Экстракцией этанолом из реакционной смеси была выделена доступная для масс-спектрометрического анализа олигосахаридная фракция **Fe-dSlmf**. По данным МАЛДИ МС положи-

тельных ионов, фракция **Fe-dSlmf** содержала набор интенсивных пиков, соответствующих ионам $[\text{Fuc}_n + \text{Na}]^+$ ($n=1-6$) (см. рис.3.14, вставка). Спектр также содержал менее интенсивные сигналы, соответствующие смешанным олигосахаридам, в которых один или несколько остатков фукозы замещены остатком другого моносакхариды, например, $[\text{Fuc}_1\text{Pent}_1 + \text{Na}]^+$ с m/z 319.0 Да и $[\text{Fuc}_1\text{Hex}_1 + \text{Na}]^+$ с m/z 349.1 Да, отстоящих от иона $[\text{Fuc}_2 + \text{Na}]^+$ с m/z 333.1 Да на -14 и +16 Да соответственно. Таким образом, несulfатированные олигосахариды, содержащие остатки пентозы и гексозы были найдены в МАЛДИ масс-спектре фракции **Fe-dSlmf**: $[\text{Fuc}_n\text{Pent} + \text{Na}]^+$, $n=1-6$ и $[\text{Fuc}_n\text{Hex} + \text{Na}]^+$, $n=1-6$.

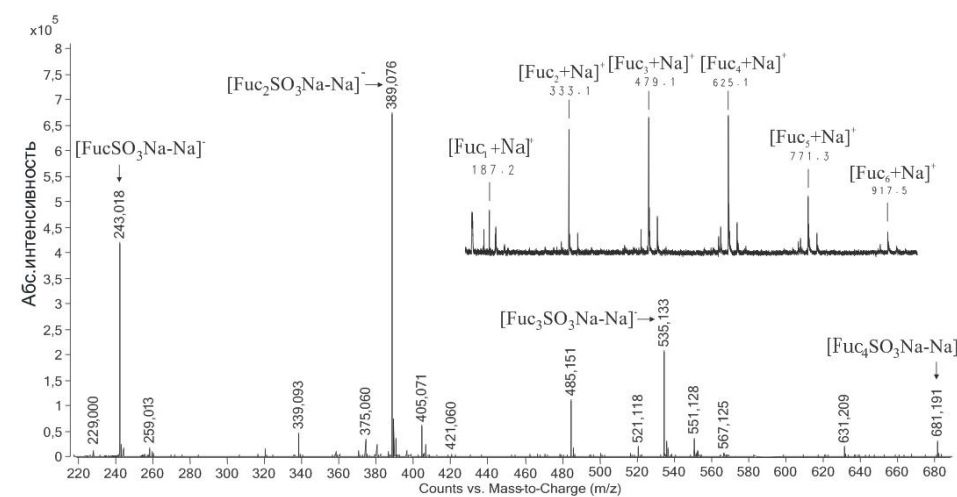


Рис. 3.14. ИЭР масс-спектр сульфатированных олигосахаридов фракции **Fe-AF1**, полученной из **Fe-dSlmf** с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Вставка содержит МАЛДИ масс-спектр положительных ионов фракции **Fe-dSlmf**, полученной в условиях сольволитического десульфатирования

МАЛДИ масс-спектр, полученный в режиме регистрации отрицательных ионов, содержал набор интенсивных пиков ионов, соответствующих моносulfатированному фукозе и фукоолигомерам со степенью полимеризации 2—4 (данные не приведены). Это означало, что десульфатирование прошло не полностью и в смеси присутствовали сульфатированные компоненты. С целью обогащения смеси анионными компонентами фракция **Fe-dSlmf** была разделена с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Фракция 1 (**Fe-AF1**), не задержавшаяся на колонке, была проанализирована с помощью ИЭР МС в режиме регистрации отрицательных ионов. Высокая чувствительность тандемного ИЭР масс-спектрометра с времяпролетным анализатором позволила обнаружить

не только сульфатированные компоненты, но и фукоолигомеры, содержащие уроновую кислоту, для большей части из которых также были получены МС/МС спектры (см рис. 3.14). Согласно моносахаридному составу фракции Fe-AF1 пентозе соответствует ксилоза (Xyl), гексозе — галактоза (Gal), уроновая кислота была идентифицирована как глюкуроновая (GlcA). Полная информация по составу данной фракции отображена в таблице 3.1.

Таблица 3.1

Значения m/z основных и минорных (*) низкомолекулярных продуктов сольволитического десульфатирования (фракция Fe-AF1) фукоидана из *F. evanescens*, полученные с помощью ИЭР МС

m/z	Состав	m/z	Состав	m/z	Состав
*229.000	$[Xyl_1SO_3Na-Na]^-$	389.076	$[Fuc_2SO_3Na-Na]^-$	535.133	$[Fuc_3SO_3Na-Na]^-$
243.018	$[Fuc_1SO_3Na-Na]^-$	*405.071	$[Fuc_1Gal_1SO_3Na-Na]^-$	*551.128	$[Fuc_2Gal_1SO_3Na-Na]^-$
*259.013	$[Gal_1SO_3Na-Na]^-$	*421.060	$[Gal_2SO_3Na-Na]^-$	*567.125	$[Fuc_1Gal_2SO_3Na-Na]^-$
*339.093	$[Fuc_1GlcA_1]^-$	485.151	$[Fuc_2GlcA_1]^-$	*631.209	$[Fuc_3GlcA_1]^-$
*375.060	$[Fuc_1Xyl_1SO_3Na-Na]^-$	*521.118	$[Fuc_2Xyl_1SO_3Na-Na]^-$	*681.191	$[Fuc_4SO_3Na-Na]^-$

Наличие в фукоидане из *F. evanescens* остатков сульфатированных ксилозы (m/z 229.006) и галактозы (m/z 259.018), а также фрагментов, содержащих уроновую кислоту ($[Fuc_nGlcA-Na]^-$, $n=1-3$), было показано нами впервые (Anastyuk et al., 2009).

Каждый ион, наблюдаемый в ИЭР масс-спектре (табл. 3.1), был подвергнут фрагментации с целью извлечения структурной информации. Стоит отметить, что отдельные сигналы ионов в масс-спектре могут соответствовать нескольким изомерам, имеющим одинаковую массу, но отличающимся положением сульфатных групп, типом связи, положением остатков различных моносахаридов и др. Однако, благодаря характеристичным фрагментам, нередко становится возможным установление структурных особенностей отдельных изомеров.

На рис. 3.15 представлена картина распада иона с m/z 229.003, соот-

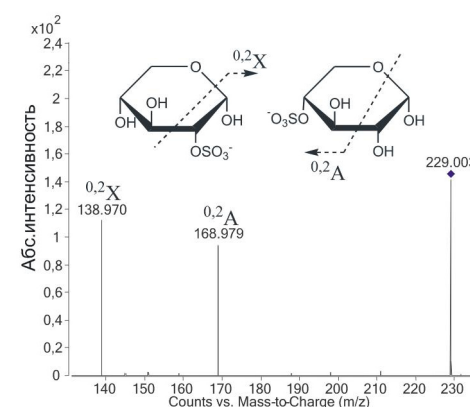


Рис. 3.15. Тандемный ИЭР масс-спектр иона $[XylSO_3Na-Na]^-$ с m/z of 229.003

ветствующего $[XylSO_3Na-Na]^-$. Интенсивные фрагменты с m/z 138.970 и 168.979 соответствовали двойным разрывам связей внутри кольца. Первый ион $^{0.2}X$ свидетельствовал о 2-О-, а второй — $^{0.2}A$ — о 4-О-сульфатировании остатка ксилозы. Следовательно, исходный полисахарид содержит 2-О- и 4-О-сульфатированные остатки ксилозы.

Тандемный масс-спектр иона фрагмента, содержащего ксилозу $[Fuc1Xyl1SO_3Na-Na]^-$ с m/z 375.059 (рис. 3.16), представлял более сложную картину.

Фрагментные ионы Z-типа с m/z 210.993 и 225.006 были образованы вследствие разрыва гликозидных связей и являлись дегидратированными сульфатированными остатками ксилозы и фукозы соответственно. Остаток сульфатированной ксилозы, находящийся на восстанавливаемом конце, давал менее интенсивные фрагментные ионы Y1-типа (значение m/z на спектре не отмечено), чем остаток сульфатированной фукозы с m/z 243.014. Интенсивный фрагментный ион $^{0.2}X_0$ с m/z 138.972 свидетельствовал о наличии сульфатной группы в основном при C2 остатков обоих моносахаридов, находящихся на восстанавли-

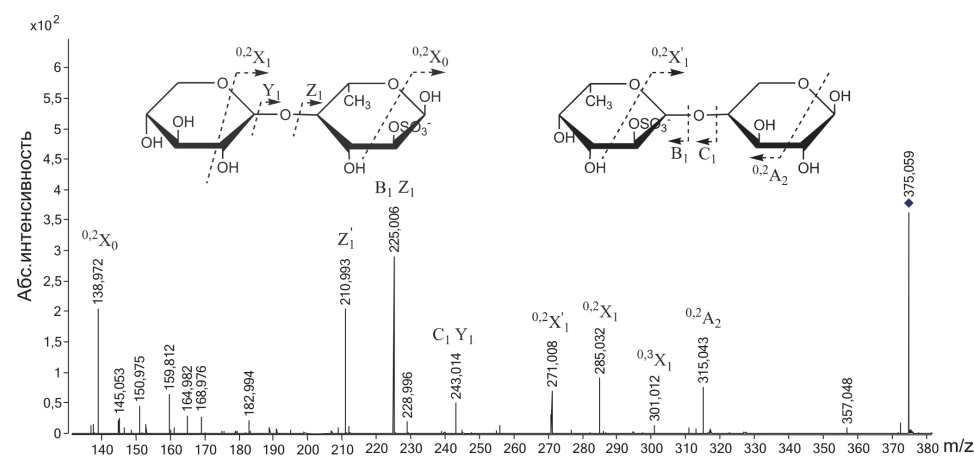


Рис. 3.16. Тандемный ИЭР масс-спектр иона $[Xyl_1Fuc_1SO_3Na-Na]^-$ с m/z 375.059

вающем конце. Однако, присутствие ионов $^{0,2}A_1$ низкой интенсивности с m/z 168.976 и 182.994 указывало на наличие сульфатных групп при C4 остатков ксилозы и фукозы, расположенных на невосстанавливаемом конце молекулы. Наличие ионов $^{0,2}X_1$ с m/z 271.008 и 285.032, а также $^{0,3}X_1$ с m/z 301.012 говорило о 2-О-сульфатировании тех же остатков. Ионы $^{0,2}X_0$ и $^{0,2}A_2$ с относительно высокой интенсивностью (последний ион возникает в случае присутствия в димере сульфатной группы на остатке моносахарида, находящегося на невосстанавливаемом конце) свидетельствовали об (1→4)-связи между остатками фукозы и ксилозы. Попытка получить однозначные данные из МС/МС спектра иона трисахарида $[Fuc_2Xyl_1SO_3Na-Na]^-$ с m/z 521.126 успехом не увенчалась.

На рис. 3.17 представлен МС/МС спектр иона $[Fuc_1GlcA-Na]^-$ с m/z 339.093. Самый интенсивный фрагментный ион $^{0,2}X_1$ с m/z 235.046 дает

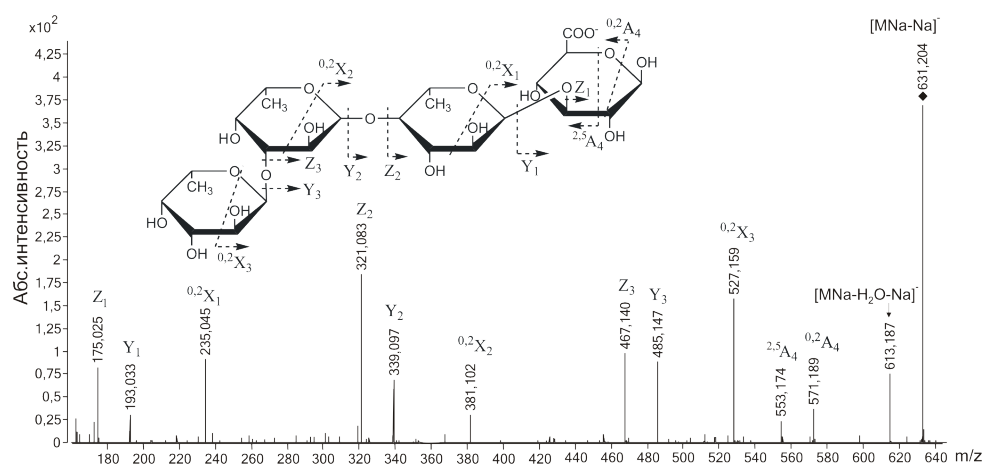


Рис. 3.17. Тандемный ИЭР масс-спектр иона $[Fuc_1GlcA-Na]^-$ с m/z 339.093

информацию о разрыве двух связей внутри кольца остатка фукозы, находящегося на невосстанавливаемом конце. Вероятно, аномально высокая интенсивность этого фрагмента обусловлена присутствием в смеси $GlcA-(1\rightarrow2)-Fuc$, когда фрагмент $^{0,2}A$ имеет указанное m/z .

Фрагментные ионы, полученные в результате разрыва гликозидных связей и имеющие m/z 193.036 и 175.025, были отнесены к ионам Z_1 и Y_1 , принадлежащим соответственно уроновой кислоте и ее дегидратированному остатку. Ион с m/z 261.061 был отнесен к $^{2,5}A_2$ -типу, что характерно для уроновых кислот, находящихся на восстанавливаемом конце (Zhang, et. al., 2006). Фрагментный ион $^{0,2}A_2$ с m/z 279.067, имеющий низкую интенсивность и, как упоминалось ранее, несущий информацию о типе связи, свидетельствовал о наличии в смеси преимущественно структур $Fuc-$

(1→3)- $GlcA$ и $GlcA-(1\rightarrow2)-Fuc$ с небольшим количеством $Fuc-(1\rightarrow4)-GlcA$.

Фрагментационные картины ионов $[Fuc_2GlcA-Na]^-$ с m/z 485.158 и $[Fuc_3GlcA-Na]^-$ с m/z 631.204 были аналогичными, поэтому нами дано описание МС/МС спектра более сложного иона (рис. 3.18).

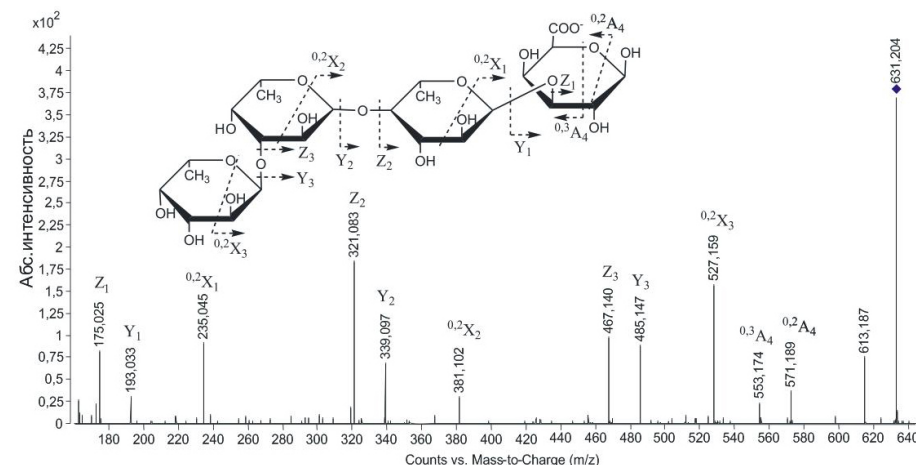


Рис. 3.18. Тандемный ИЭР масс-спектр иона $[Fuc_3GlcA-Na]^-$ с m/z 631.204

Спектр содержал интенсивные ионы, соответствующие разрывам гликозидных связей. Ионы Z_3 и Y_3 с m/z 467.140 и 485.147 соответствовали отщеплению с невосстанавливающего конца фукозы и ее дегидратированной формы; ионы Z_2 и Y_2 с m/z 321.083 и 339.097 — фукобиозы и ее дегидратированной формы и т.д. Спектр также содержал фрагментные ионы $^{0,2}A_4$ и $^{0,3}A_4$ с m/z 553.174 и 571.189, характерные для фрагментации уроновой кислоты, находящейся на восстанавливаемом конце (см. описание МС/МС спектра иона $[Fuc_1GlcA-Na]^-$) и не содержал ионов $^{0,3}A$ или $^{0,3}X$, которые свидетельствуют о наличии разветвлений. Анализ спектра позволил сделать вывод о линейном строении данного фрагмента, имеющего уроновую кислоту на восстанавливаемом конце. Отсутствие сульфатных групп, влияющих, по-видимому, на интенсивность сигналов $^{0,2}X$, а также определенное положение уроновой кислоты позволило полуколичественно оценить $^{0,2}X$ -фрагменты, полученные из остатка фукотриозы, сравнивая их интенсивности. Фрагментный ион $^{0,2}X_3$ с m/z 527.159, соответствующий двойному разрыву кольца фукозы на восстанавливаемом конце, имел наибольшую интенсивность из-за наличия незамещенного протона в гидроксиле при C3, участвующего в механизме образования фрагментных ионов данного типа, как уже было сказано выше. Фрагментный ион $^{0,2}X_2$ с m/z 381.102, принадлежащий второму остатку фукозы с восстанавливаемого конца, имел значительно

меньшую интенсивность, что указывало на (1→3)-связь между остатками фукозы. Интенсивность следующего фрагмента $^{0,2}X_1$ с m/z 235.045, образующегося из третьего по счету с невосстанавливающего конца остатка фукозы, была примерно в 3 раза выше, указывая на преобладание (1→4)-связи между третьим и соседним с ним остатком фукозы. Низкая интенсивность фрагментного иона $^{0,2}A_4$ урановой кислоты с m/z 571.204 также свидетельствовала о преимуществе (1→3)-связи между остатками фукозы в этой позиции.

На основании МС/МС анализа можно представить наиболее вероятную структуру данного олигомера как Fuc-(1→3)-Fuc-(1→4)-Fuc-(1→3)-GlcA. Подобный тандемный масс-спектр иона $[Fuc_2GlcA-Na]^-$ с m/z 485.151 (данные не приведены) свидетельствовал о преобладании структуры Fuc-(1→4)-Fuc-(1→3)-GlcA. Это вполне согласуется со структурой фракции фукоидана из *F. evanescens*, опубликованной в работе (Bilan et al., 2002), которая представляет собой линейную цепь, построенную из сульфатированных остатков фукозы с чередующимися (1→3)- и (1→4)-связями. Фрагменты, представляющие фукоолигосахариды, имеющие глюкуроновую кислоту в своем составе, обнаруженные нами в фукоидане из *F. evanescens*, построены подобным образом.

Анализ фрагментационной картины интенсивного иона $[FucSO_3Na-Na]^-$ с m/z 243.016 (данные не приведены) дал результаты, согласующиеся с полученными ранее для *A. nodosum* (Daniel et al., 2007). Интенсивность иона $^{0,2}A$ с m/z 182.996 (фрагмент 4-О-сульфатированной фукозы) была примерно в 2 раза ниже, чем интенсивность иона $^{0,2}X$ с m/z 138.971 (фрагмент 2-О-сульфатированной фукозы). Полученные результаты согласуются с литературными данными (Bilan et al., 2002, Kusaykin et al., 2006), из которых следует, что остатки фукозы в фукоидане из *F. evanescens* сульфатированы в основном при C2.

Фрагментационные картины наиболее интенсивного иона $[Fuc_2SO_3Na-Na]^-$ с m/z 389.082 и иона $[Fuc_3SO_3Na-Na]^-$ с m/z 535.131 были похожи, поэтому мы привели анализ МС/МС спектра последнего иона (рис. 3.19). Наиболее интенсивными ионами МС/МС спектра были сульфатированная фукоза (m/z 243.017) и ее дегидратированная форма (m/z 225.007), образовавшиеся в результате разрыва гликозидных связей.

В спектре были найдены менее интенсивные фрагментные ионы с m/z 389.074 и 371.065, соответствующие сульфатированной фукобиозе и ее дегидратированной форме. Кроме того, имелись сигналы ионов $^{0,2}X_0$ и $^{0,2}X_1$, получающиеся в результате двойного разрыва моносахаридного кольца с m/z 138.971 и с m/z 285.029, которые также давали информацию о сульфатировании гидроксиллов при C2 остатков фукозы на восстано-

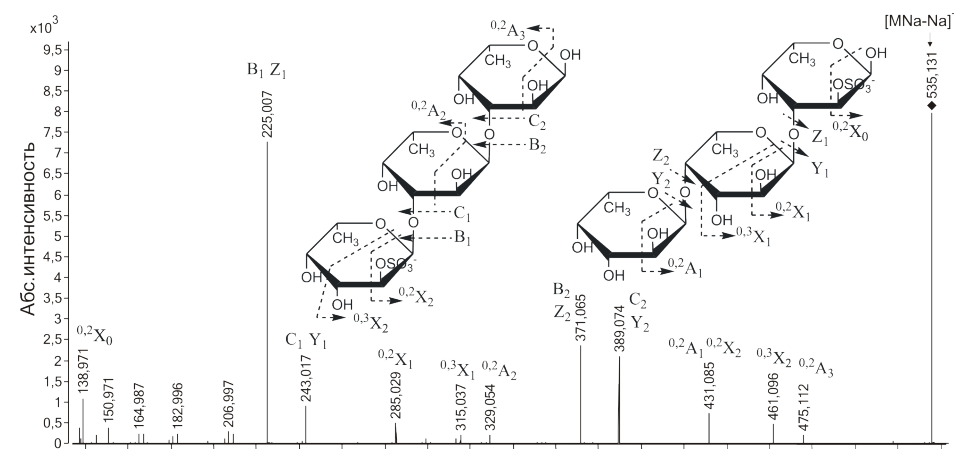


Рис. 3.19. Тандемный ИЭР масс-спектр иона $[Fuc_3SO_3Na-Na]^-$ с m/z 535.131

вивающем конце и соседнего с ним. Фрагментный ион $^{0,2}X_2$ с m/z 431.085 возникал из сульфатированного при C2 остатка фукозы, находящегося на невосстанавливающем конце. Присутствие фрагментного иона малой интенсивности с m/z 182.996 свидетельствовало о 4-О-сульфатировании невосстанавливающего остатка фукозы. Фрагментные ионы, несущие информацию о 4-О-сульфатировании других остатков фукозы в олигомере, обнаружены не были. Ион $^{0,2}A_2$ низкой интенсивности с m/z 329.054 (по сравнению с ионом $^{0,2}X_2$ с m/z 431.085, полученным из невосстанавливающего остатка со свободным гидроксильной группой при C3) давал информацию о вероятности (1→3)-связи между остатками фукозы на невосстанавливающем конце (рис. 3.19, слева). Однако, МС/МС спектр содержал ионы $^{0,3}X_1$ с m/z 315.037 и $^{0,2}X_1$ с m/z 285.029, указывающие на наличие (1→4)-связи между этими же остатками (рис. 3.19, справа). Ион очень низкой интенсивности $^{0,2}A_3$ с m/z 475.112 и вышеупомянутый $^{0,2}X_0$ свидетельствовали о вероятности (1→3)-связи между остатками фукозы, находящимися на восстанавливающем конце. Таким образом, методом МС/МС обнаружены фрагменты фукоидана, построенные из сульфатированных остатков фукозы с чередующимися (1→3)- и (1→4)-связями, что также находится в соответствии с результатами предыдущих исследований (Kusaykin et al., 2006). Анализ более протяженных сульфатированных фукоолигосахаридов не дал столь четких результатов из-за большого количества шума в спектре и сложности в интерпретации.

Использование тандемной масс-спектрометрии позволило установить структурное значение в фукоидане из *F. evanescens* еще одного минорного компонента – галактозы. МС/МС спектр иона с m/z 259.018, соответствующего $[GalSO_3Na-Na]^-$, давал информацию о C2 и C4/C6 сульфатировании

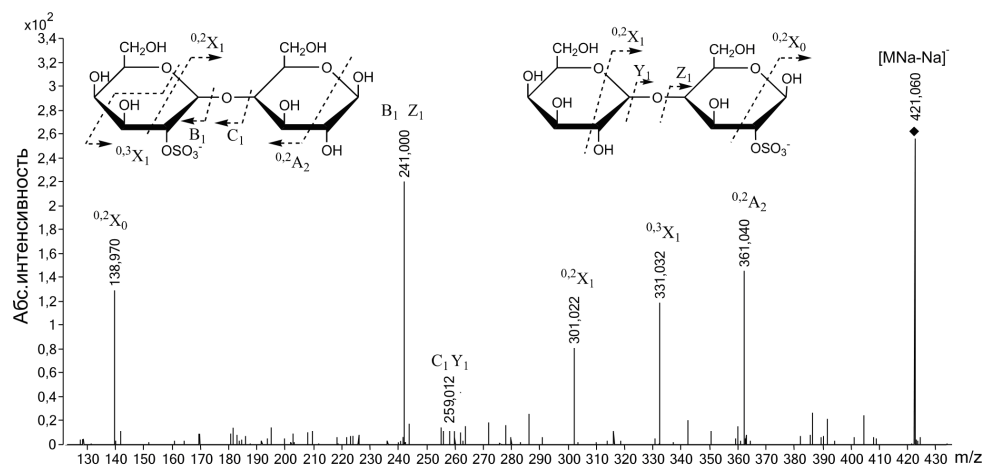


Рис. 3.20. Тандемный ИЭР масс-спектр иона $[\text{Gal}_2\text{SO}_3\text{Na-Na}]^+$ с m/z 421.060

остатков галактозы. МС/МС спектр иона $[\text{Gal}_2\text{SO}_3\text{Na-Na}]^+$ с m/z 421.060 (рис. 3.20) содержал интенсивный фрагментный ион с m/z 241.000 и менее интенсивный с m/z 259.012. Образование этих ионов связано с разрывом гликозидных связей и отщеплением дегидратированного остатка сульфатированной галактозы и сульфатированной галактозы соответственно.

Ион $^{0.2}\text{X}_0$ с m/z 138.970 указывал на сульфатирование остатка галактозы на восстанавливающем конце при С2. Фрагментные ионы $^{0.2}\text{X}_1$ с m/z 301.022 и $^{0.3}\text{X}_1$ с m/z 331.032 свидетельствовали о 2-О-сульфатировании остатка галактозы, находящегося на невосстанавливающем конце. Фрагменты, характерные для сульфатирования остатка галактозы при С4, отсутствовали. Таким образом, МС/МС-анализ позволил обнаружить и установить структуру галактозосодержащих фрагментов фукоидана: $\text{Gal}_2\text{SO}_3^-(1\rightarrow4)\text{-Gal}$ и $\text{Gal-(1}\rightarrow4)\text{-Gal}_2\text{SO}_3^-$.

Галактоза входила также в состав смешанного дисахарида $[\text{Fuc}_1\text{Gal}_1\text{SO}_3\text{Na-Na}]^+$ с m/z 405.070, присутствующего в МС-спектре. Как и в случае с предыдущими сульфатированными дисахаридами, этот ион содержал несколько изомеров, различающихся положением в них моносахаридных остатков и сульфатных групп. МС/МС спектр (рис. 3.21) содержал интенсивные ионы с m/z 225.007 и 241.003, образование которых связано с разрывом гликозидных связей и отрывом сульфатированных остатков дегидратированной фукозы и галактозы. Фрагментные ионы $^{0.2}\text{X}$ -типа с m/z 285.029 и 301.021 указывали на 2-О-сульфатирование невосстанавливающих остатков фукозы и галактозы.

Фрагментный ион $^{0.2}\text{A}_1$ с m/z 198.992 (на рисунке не отмечен) указывал на 4-О-сульфатирование невосстанавливающего остатка галактозы,

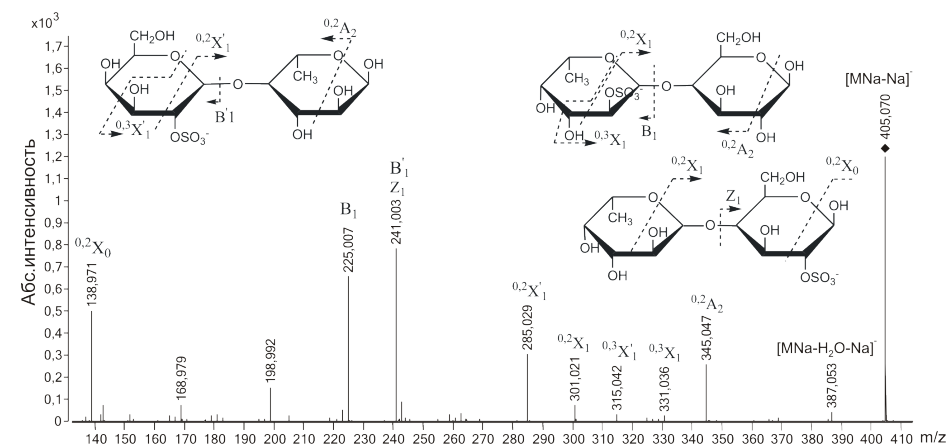


Рис. 3.21. Тандемный ИЭР масс-спектр иона $[\text{Fuc}_1\text{Gal}_1\text{SO}_3\text{Na-Na}]^+$ с m/z 405.070

следов 4-О-сульфатирования остатков фукозы не обнаружено. Присутствие ионов $^{0.2}\text{A}_2$ с m/z 345.047 и $^{0.2}\text{X}_0$, указывает на наличие (1→4)-связи, однако наличие (1→3)-связи не может быть исключено, т.к. в таком случае, как уже было неоднократно отмечено, не образуются фрагментные ионы $^{0.2}\text{X}$ и $^{0.2}\text{A}$. Наличие иона $^{0.3}\text{X}_0$ с m/z 168.979 также подтверждает присутствие структурного варианта $\text{Fuc-(1}\rightarrow4)\text{-Gal-2-SO}_3^-$ в исследуемой смеси, т.к. для остатков сульфатированной галактозы вероятность фрагментации по типу $^{0.3}\text{X}$ была выше, чем для остатков фукозы (см. описание МС/МС спектра сульфатированной галактозы). Таким образом, масс-спектрометрический анализ показал наличие в смеси ионов $\text{Gal-(1}\rightarrow4)\text{-Fuc-2-SO}_3^-$, $\text{Gal-2-SO}_3^-(1\rightarrow4)\text{-Fuc}$ и незначительное количество $\text{Fuc-(1}\rightarrow4)\text{-Gal-2-SO}_3^-$. Остаток галактозы на невосстанавливающем конце может быть сульфатирован при С4.

Картина масс-спектрометрической фрагментации иона $[\text{Fuc}_1\text{Gal}_2\text{SO}_3\text{Na-Na}]^+$ с m/z 567.124 (см. рис. 3.22) была наиболее сложной для интерпретации. Тем не менее, спектр был интерпретирован аналогично предыдущим.

В результате был сделан вывод о преобладающих структурах исследуемого иона: $\text{Gal-(1}\rightarrow4)\text{-Gal-(1}\rightarrow3)\text{-Fuc}$ и $\text{Fuc-(1}\rightarrow3)\text{-Gal-(1}\rightarrow4)\text{-Gal}$, сульфатированные в основном при С2 остатков фукозы и галактозы, иногда — при С4 остатка галактозы.

Исследование фукоидана из *F. evanescens* было продолжено с использованием более мягких условий деполимеризации для получения мультисульфатированных фрагментов. Результаты исследования мультисульфатированных фрагментов фукоидана из *F. evanescens*, представлены в работе (Anastyuk et al., 2012). Необходимо отметить, что фукоидан был выделен нами в более «мягких» условиях, чем в работе (Kusaykin et al., 2006). С по-

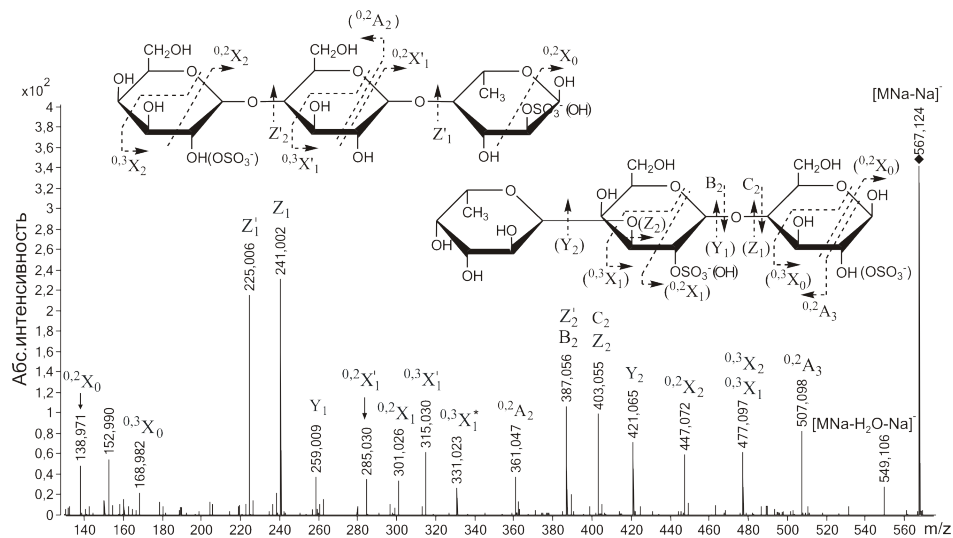


Рис. 3.22. Тандемный ИЭР масс-спектр иона $[Fuc_1Gal_2SO_3Na-Na]^+$ с m/z 567.124. Структурные варианты с иным расположением сульфатных групп и соответствующие фрагменты заключены в скобки

мощью автогидролиза (5 мг/мл) мы получили смесь олигосахаридов, состав которой был определен с помощью МАЛДИ МС. Смесь состояла из моносульфатированной фукозы и набора фукоолигосахаридов с четной степенью полимеризации (2–6), с числом сульфатных групп до 5. Олигосахариды, содержащие минорные моносахариды (в данном случае – галактозу, исходя из моносахаридного состава смеси), также были обнаружены (Рис. 3.23).

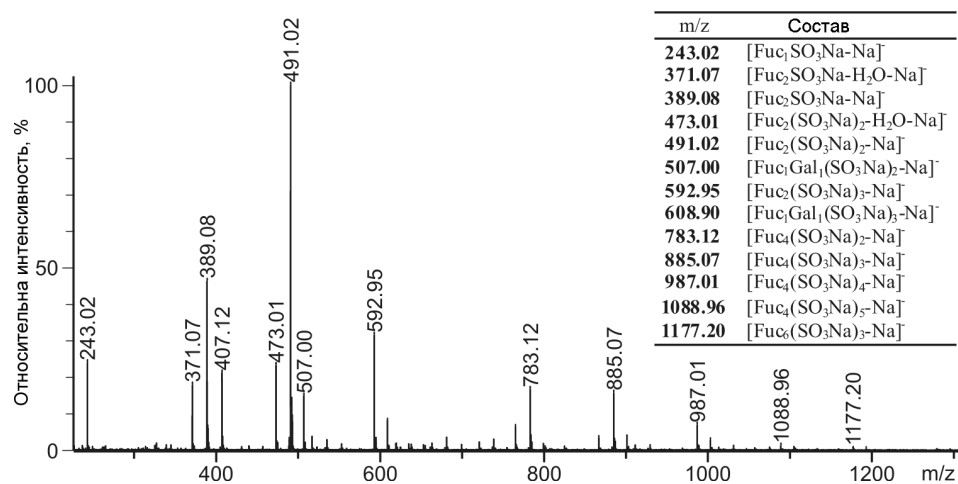


Рис. 3.23. МАЛДИ масс-спектр отрицательных ионов олигосахаридов, полученных автогидролизом фукоидана из бурой водоросли *F. evanesceus*

Структурные характеристики олигосахаридов были установлены с помощью МАЛДИ МС/МС. Основной компонент смеси – дисульфатированная фукобиоза имела преимущественно (1→4)-гликозидную связь между остатками фукозы (Anastyuk et al., 2012). Ее тандемный масс-спектр представлен на рисунке 3.24.

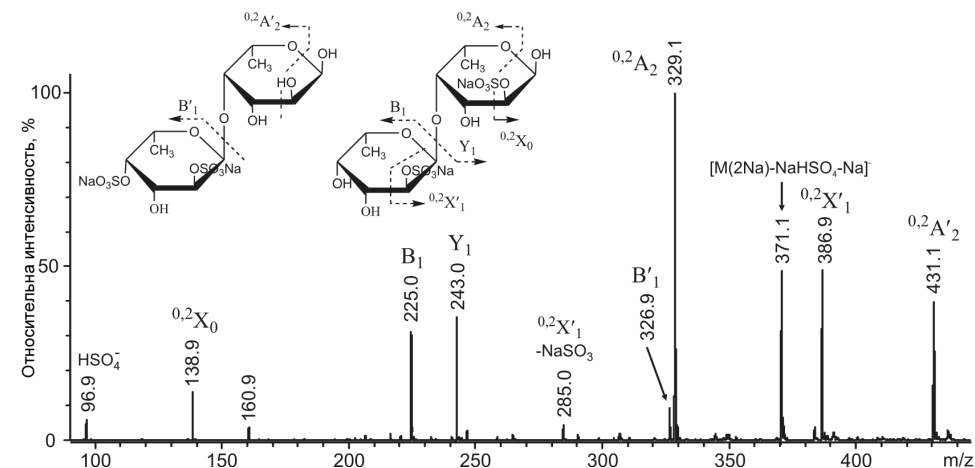


Рис. 3.24. Тандемный МАЛДИ масс-спектр иона $[Fuc_2(SO_3Na)_2-Na]^+$ с m/z 491.0

По характеру интенсивностей фрагментных ионов масс-спектр оказался более похож на тандемный масс-спектр дисульфатированной фукобиозы, выделенной из фукоидана *A. nodosum*, где авторами было отмечено существенное количество (1→4)-связанных остатков α-L-Fucp. (Daniel et al., 2007) При этом, из спектра не следовало, есть ли в смеси (1→3)-связанные остатки α-L-Fucp.

Этот вопрос был снят при анализе иона трисульфатированной фукобиозы с m/z 593.0. (рис. 3.25). Благодаря наличию дополнительной сульфатной группы, мы смогли наблюдать Y-ион с m/z 344.9, соответствующий отщеплению дважды сульфатированного остатка фукозы с восстанавливающего конца молекулы. Поскольку в фу-

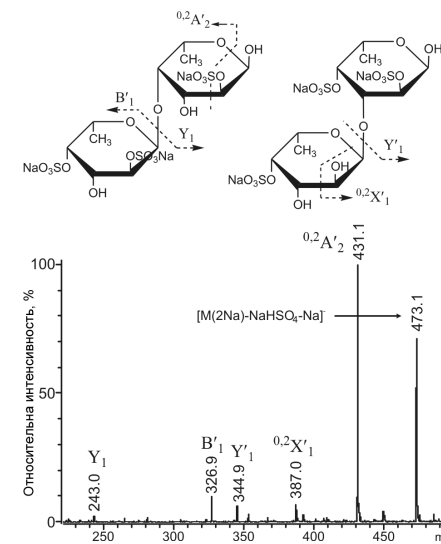


Рис. 3.25. Тандемный МАЛДИ масс-спектр иона $[Fuc_2(SO_3Na)_3-Na]^+$ с m/z 593.0

коидане из *F. evanescens* сульфатирование при С3 остатка α -L-Fucp не было обнаружено (Bilan et al., 2002), был сделан вывод о присутствии некоторого количества (1 \rightarrow 3)-связанных остатков α -L-Fucp (рис. 3.24).

Остатки гексозы (D-Gal) были обнаружены в составе ди- и трисульфатированных дисахаридов типа FucHex. По результатам анализа тандемного масс-спектра (рис. 3.26), было предложено 3 варианта строения дисахарида: Gal-2-OSO₃Na-(1 \rightarrow 3)-Gal-2-OSO₃Na, Gal-2,4-ди-OSO₃Na-(1 \rightarrow 4)-Fuc и Fuc-2-OSO₃Na-(1 \rightarrow 4)-Gal-2-OSO₃Na. Полученные данные дополняют результаты работы (Anastyuk et al., 2009), в которой мы наблюдали только моносульфатированные остатки галактозы. Стоит отметить, что указанные остатки (рис. 3.25) находились преимущественно на восстановляющем конце молекулы. Более протяженные и более сульфатированные олигосахариды также были проанализированы с помощью тандемной МАЛДИ МС (Anastyuk et al., 2012). Они были построены из чередующихся 3- и 4-связанных остатков α -L-Fucp, сульфатированных в положении С2, реже С4 в случае некоторых (1 \rightarrow 3)-связанных остатков фукозы. (1 \rightarrow 4)-Связанные остатки фукозы преимущественно находились на восстанавливающем конце молекул и были слабо сульфатированы. По всей видимости, в условиях автогидролиза в первую очередь расщепляется именно (1 \rightarrow 3)-гликозидная связь, чем и объясняется пре-

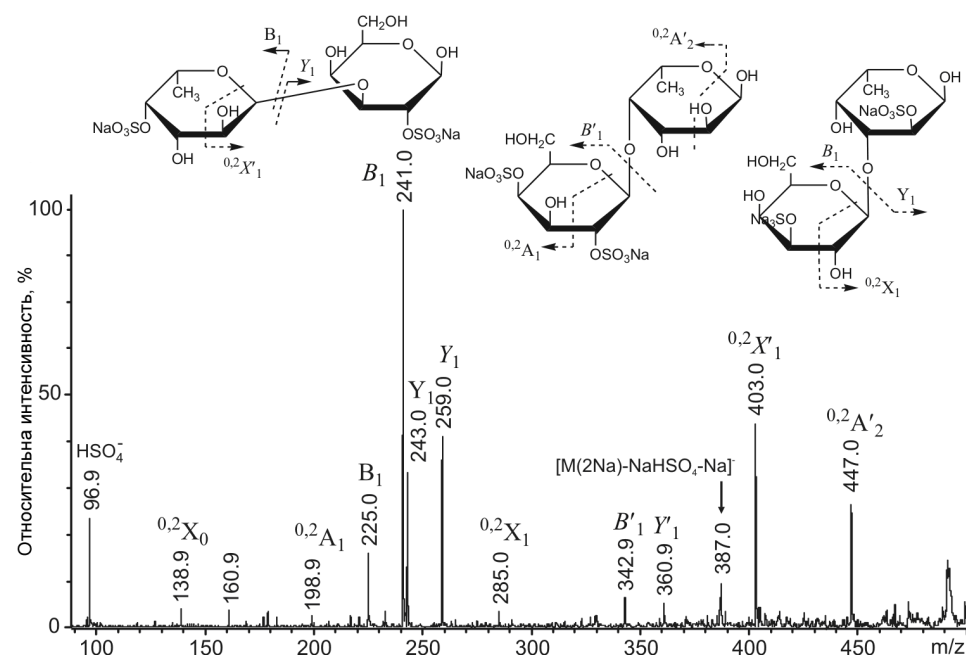


Рис. 3.26. Тандемный МАЛДИ масс-спектр иона $[Fuc_1Gal_1(SO_3Na)_2-Na]^+$ с m/z 507.0

обладание ионов сахаров с четной степенью полимеризации в спектре на рис. 3.23. Полученные нами структуры соответствовали структурам, установленным в работе (Bilan et al., 2002), с использованием независимых методов. Таким образом, нами было показано, что использование автогидролиза как альтернативного метода деполимеризации фукоиданов позволяет надежно получать мультисульфатированные олигосахариды, отвечающие фрагментам исходного фукоидана.

В работах (Anastyuk et al., 2010; Anastyuk et al., 2012) нам удалось показать, что использование тандемной МАЛДИ МС не уступает возможностям тандемной ИЭР МС и даже имеет некоторые преимущества: удобнее работать со смесями и интерпретировать тандемные масс-спектры благодаря тому, что источник МАЛДИ продуцирует только однозарядные ионы. Возможность использовать тандемную МАЛДИ МС появилась благодаря специально подобранной нами матрице, с помощью которой удалось добиться минимальной фрагментации исследуемых образцов в ионном источнике.

Заключение

С помощью масс-спектрометрического анализа нами были исследованы структурные особенности фукоиданов из трех видов бурых водорослей: *S. gurjanovae*, *F. evanescens*, *S. cichorioides*. Фукоиданы из *S. gurjanovae* и *S. cichorioides* были исследованы впервые в ТИБОХ ДВО РАН (Шевченко и др., 2007). Для получения олигосахаридов, доступных для масс-спектрометрического анализа, были также впервые разработаны условия деполимеризации фукоиданов различными методами: сольволитическим десульфатированием, автогидролизом и частичным кислотным гидролизом.

Фукоидан из *S. gurjanovae* был деполимеризован в условиях сольволитического десульфатирования и частичного кислотного гидролиза. С помощью МАЛДИ масс-спектрометрии среди низкомолекулярных продуктов деполимеризации в процессе сольволиза кроме фукозы $[Fuc+Na]^+$ и $[FucSO_3]^-$ были обнаружены нейтральные фукоолигосахариды: $[Fuc_n+Na]^+$, $n=2-11$, сульфатированные фукоолигосахариды $[Fuc_nSO_3]^-$, $n=2-11$, а также смешанные олигосахариды: $[Fucn-mGal_m+Na]^+$, $n=4-6$, $m=1-3$; $[Fuc_nGal_mSO_3]^-$, $n=3-6$, $m=1-2$. Обнаружение смешанных олигосахаридов свидетельствует о блочном строении фукоидана. Протяженность блоков, построенных из фукозы, была достаточно велика и достигала 11, а возможно и более остатков. В продуктах частичного кислотного гидролиза, напротив, преобладали галактозосодержащие олигосахариды: $[Gal_n+Na]^+$, $n=2-5$, $[Gal_nSO_3]^-$, $n=2-3$, причем фукоза в смеси была найдена

только в виде ионов мономеров $[\text{Fuc}+\text{Na}]^+$ и $[\text{Fuc}_1\text{SO}_3]^-$ и в составе иона $[\text{Fuc}_1\text{Gal}_1\text{SO}_3]$. Размер максимального блока, построенного из галактозы, равен пяти. Интересно отметить, что в условиях кислотного гидролиза более лабильными являются гликозидные связи между остатками дезоксигексозы (фукозы), а при сольволизе — между остатками галактозы. Впервые, с помощью химических и физико-химических методов было показано, что фукоидан из *S. gurjanovae* представляет собой галактофукан блочного строения, сульфатированный и частично ацетилованный как по остаткам фукозы, так и галактозы. Размеры блоков, построенных из галактозы, находятся в интервале от двух до пяти, а из фукозы — от двух до одиннадцати. В среднем на 5 остатков фукозы приходилось 2-3 остатка галактозы. Исследуемый фукоидан отличается от аналогичных полисахаридов, выделенных из других видов семейства ламинариевых, которые представляют собой сульфатированные (1→3)- α -L-фуканы (Усов, Билан, 2009; Kusaykin et al., 2008), хотя повышенное содержание галактозы отмечалось для фукоиданов из *S. japonica* (Zvyagintseva et al., 2003) и *S. cichorioides* (Yoon et al., 2007).

Фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens*, по одним данным представлял линейную цепь с чередующимися 3- и 4-связанными остатками α -L-Fucp, сульфатированными в положении 2 или много реже 2 и 4. По другим данным фракция фукоидан из *F. evanescens* также являлся 1→3;1→4- α -L-фуканом с преобладанием (1→3)-связанных остатков фукозы (1→3:1→4 = 3.5:1) (Kusaykin et al., 2006).

Для деполимеризации выделенного из *F. evanescens* по методу (Kusaykin et al., 2006) фукоидана было применено сольволитическое десульфатирование, в результате которого был получен набор олигосахаридов со степенью полимеризации до 6. Согласно данным масс-спектрометрического анализа (Anastyuk et al., 2009), этот фукоидан содержал протяженные участки, построенные из (1→3)-связанных остатков α -L-Fucp (до трех, и, возможно, более), сульфатированных в основном в положении C2. С помощью тандемной МАЛДИ МС (Anastyuk et al., 2012) нами были получены данные о строении основной цепи, согласующиеся с работой (Bilan et al., 2002), поскольку фукоидан в этом случае был выделен и деполимеризован в более «мягких» условиях. Было показано, что автогидролиз позволяет эффективно получать мультисульфатированные олигосахариды, отвечающие фрагментам фукоидана.

Впервые в фукоидане нами были найдены структурные фрагменты, содержащие остатки ксилозы, галактозы и глюкуроновой кислоты, обнаруженные ранее в моносахаридном составе фукоидана из *F. evanescens* в минорных количествах. Фрагменты, содержащие глюкуроновую кислоту на

восстанавливающем конце, состояли из чередующихся 3- и 4-связанных остатков α -L-Fucp. Полученные данные (Anastyuk et al., 2009) находятся в соответствии с результатами предыдущих исследований (Kusaykin et al., 2006). Кроме того, нами впервые было показано, что остатки ксилозы и галактозы включены в цепь фукоидана. Остаток ксилозы в основном 2-О-сульфатирован и может быть связан (1→4)-связью с остатками α -L-Fucp. Остатки 2-О-сульфатированной галактозы (до двух) между собой могут быть связаны (1→4)- или (1→3)-связями, а с остатками α -L-Fucp - (1→4)-связью. Ранее только для фукоидана бурой водоросли *Fucus serratus* было показано (Bilan et al., 2006) наличие β -(1→4)-связанных остатков ксилозы (до шести), входящих в основную цепь.

Фукоидан из *S. cichorioides* исследовался ранее в работах (Zvyagintseva et al., 2003; Yoon et al., 2007). Полученные нами данные согласуются с выводами, сделанными в работе (Zvyagintseva et al., 2003), согласно которым этот фукоидан представляет собой высокосульфатированный (1→3)- α -L-фукан, но находятся в противоречии с результатами, полученными в работе (Yoon et al., 2007), согласно которым фукоидан из *S. cichorioides* представляет собой галактофукан (Fuc:Gal~2:1), остатки α -L-фукозы в котором (1→4)-связаны и 2,3-О-дисульфатированы. В условиях автогидролиза, впервые примененного нами для деградации фукоиданов, были получены сульфатированные и нейтральные фукоолигосахариды с максимальной степенью полимеризации (n) до 7. Результаты анализа с помощью ИЭР и МАЛДИ МС/МС сульфатированной α -L-фукозы и фукоолигосахаридов с $n=2-3$ показали следующее: остатки 2-О- и 4-О-сульфатированной α -L-фукозы были соединены в основном (1→3)-связями. Содержание (1→4)-связанных остатков α -L-фукозы было незначительным. Данные о структурном состоянии остатков гексозы не были получены, поскольку в продуктах деполимеризации фукоидана фрагменты, их содержащие, не были обнаружены.

При интерпретации тандемных масс-спектров сульфатированных олигосахаридов в основном были использованы результаты работ (Tissot B. et al., 2006) и (Daniel R. et al., 2007). Тем не менее, в процессе исследований нами были сделаны следующие уточнения: механизм формирования фрагментов $^{0,3}\text{X}$, наблюдаемых во всех сульфатированных фукоолигосахаридах, по-видимому, требует наличия сульфатной группы в положениях C3 (Tissot et al., 2006) или C2 (Daniel et al., 2007), поскольку подобные сигналы не наблюдались в МС/МС спектрах олигосахаридов, содержащих уоновую кислоту на восстанавливающем конце (Anastyuk et al., 2009). На интенсивность сигналов $^{0,2}\text{X}$ в случае замещения гликозидного гидроксила влияет наличие сульфатной группы в положении C2, так

как сигналы $^{0,2}X$ для фукоуридных фрагментов имели более высокую интенсивность, чем для сульфатированных фукоолигосахаридов. Следовательно, при наличии замещенного атома водорода гликозидного гидроксила механизм образования иона $^{0,2}X$ для олигосахаридов отличается от предложенного ранее (Minamisawa, Hirabayashi, 2005; Tissot et al., 2006) для сульфатированных моносахаридов. Это наблюдение позволяет точнее по соотношению интенсивностей фрагментов $^{0,2}X$ и $^{0,3}X$ определить положение сульфатной группы.

Глава 4. Проблемы стандартизации препаратов полисахаридов бурых водорослей

Стандартизация полисахаридов кажется нам проблематичной по ряду причин: известно, что разные виды бурых водорослей синтезируют существенно различающиеся по строению полисахариды; отдельный вид водоросли синтезирует характерный для него набор полисахаридов, который может содержать несколько структурных типов фукоиданов, равно как ламинаранов и альгиновых кислот; состав и структура полисахаридов может зависеть от вида и сезона сбора водоросли и, по всей видимости, от ее репродуктивного статуса. Условия процессов предобработки водоросли и экстракции полисахаридов также имеют значение при получении биополимеров. Воспроизводимость стандартных характеристик отдельных препаратов очень важна для создания БАД, пищевых добавок и, в особенности, для лекарств. Поэтому нами большое внимание уделено исследованию влияния вышеперечисленных факторов на состав и структуру полисахаридов водорослей.

Влияние эндо- и экзогенных факторов на содержание и структурные характеристики полисахаридов бурых водорослей морей Дальнего Востока России

Сведения о влиянии эндо- и экзогенных факторов на композицию и структуру полисахаридов бурых водорослей чрезвычайно ограничены, особенно это относится к фукоиданам, интерес к которым в настоящее время только возрастает. В последние годы активно изучаются разносторонняя биологическая активность, проявляемая фукоиданами, и возможности их использования для создания лекарственных средств и биологически активных добавок к пище.

Фукоиданы — сульфатированные полисахариды бурых водорослей, представляют собой чрезвычайно структурно разнородную группу. Непременным и часто главным компонентом молекул большинства из них служат остатки α -L-фукозы, этерифицированные серной кислотой. В составе фукоиданов обычно находят другие моносахариды (галактозу, маннозу, ксилозу, рамнозу, глюкуроновую кислоту), а также ацетильные группы. Анализ литературы показывает, что биологические свойства этих полисахаридов связаны с типами фукоиданов, определяемыми структурой их основной цепи, молекулярной массой, содержанием и расположением сульфатных и ацетатных групп (Cumashi et al., 2007; Li et al., 2008).

В настоящее время из бурых водорослей выделили фукоиданы, кото-

рые условно можно разбить на структурные типы следующим образом: фуканы (1,3- и 1,3;1,4- α -L-фуканы), саргассаны (галактофуканы), аскофилланы (фукоманноуронаны или фукогалактоманноуронаны) и другие промежуточные структуры (Bertheau et al., 2003). В связи с этим возникает серьезная проблема стандартизации препаратов, которая осложняется тем, что состав и структура полисахаридов зависит не только от вида водоросли, но и от других как внешних, так и внутренних факторов.

В меньшей степени это касается альгиновых кислот и их водорастворимых аналогов. Установлено, что альгиновые кислоты вегетативных растений состоят, главным образом, из остатков маннурановой кислоты, и поэтому аналогичны в разных видах водорослей. Генеративные растения накапливают альгиновые кислоты с большим или меньшим содержанием гулурановой кислоты, что приводит к видоспецифической разнице в структуре и свойствах альгиновых кислот (Jothisarawathi et al., 2006). Данные о влиянии споронии на содержание альгиновых кислот в тканях водорослей весьма противоречивы: одни исследователи отмечали накопление этих полисахаридов в фертильных растениях или частях растений, содержащих репродуктивные структуры (Nishide et al., 1988), другие, напротив, нашли снижение содержания альгината в тканях при развитии сорусов (Hosoda, 1979; Ароуа et al., 2002).

Сведения о различиях в содержании и структуре фукоиданов в зависимости от вида, сезона или стадии развития водоросли еще более ограничены (Rioux et al., 2009; Норуа et al., 1999). Считают, что фукоиданы являются видоспецифическими полисахаридами, однако сложности со стандартизацией в данном случае связаны с тем, что один вид водоросли может синтезировать несколько типов фукоиданов. Так, из *Fucus vesiculosus* выделено 16 фракций фукоиданов, имеющих различный моносхаридный состав (Fitton, 2005). Кроме того, содержание и структура этих полисахаридов претерпевают значительные изменения в течение жизненного цикла водоросли (Имбс и др., 2009; Skriptsova et al., 2010). Норуа с соавторами исследовали изменение содержания и моносхаридного состава фукоидана из *Saccharina japonica* в зависимости от сезона (Норуа et al., 1999). Немногочисленными исследованиями (Усов и др., 2005б) показано, что споронии значительно влияет на состав фукоидана и что наибольшее количество фукоиданов накапливается в репродуктивных органах бурых водорослей. В публикациях (Rioux et al., 2009; Zvyagintseva et al., 2005) изучали влияние возраста растений на содержание фукоидана. Анализ имеющихся в литературе данных о влиянии эндо- и экзогенных факторов на композиции и структуру полисахаридов бурых водорослей позволил нам сделать предположительный вывод о

том, что содержание и структура полисахаридов значительным образом могут зависеть от репродуктивного статуса водоросли. В особенности это справедливо для фукоиданов.

С целью подтверждения этого предположения нами были выбраны широко распространенные в морях Дальнего Востока водоросли: *Saccharina japonica* f. *diabolica*, *Costaria costata*, *Undaria pinnatifida*, *Alaria ochotensis*, *Fucus evanescens*, *Silvetia babingtonii* и *Sargassum pallidum* для изучения зависимости моносхаридного состава водорастворимых полисахаридов и, соответственно, содержания фукоидана и ламинарана, а также альгиновых кислот от вида и стадии развития водоросли. Краткая общая характеристика исследованных образцов дана в табл. 4.1.

Для стерильной и фертильной тканей семи видов бурых водорослей (*S. japonica* f. *diabolica*, *F. evanescens*, *S. babingtonii*, *S. pallidum*, *A. ochotensis*), относящихся к разным семействам, был проведен сравнительный анализ содержания полисахаридов (альгиновых кислот, ламинарана и фукоидана) (Skriptsova et al., 2012). Основная часть полисахаридов, выбранных для исследования водорослей, была представлена альгинатами (табл. 2). Наиболее высокое содержание этого полисахарида отмечено у водоросли *S. japonica* f. *diabolica*, находящейся в стерильном состоянии. Содержание альгинатов в остальных образцах бурых водорослей различалось незначительно и находилось, в основном, в интервале от 20 до 30 %. Ранее отмечалось, что содержание альгиновой кислоты в ламинариевых водорослях в среднем выше, чем в фукусовых (Суховеева и др., 2006), эти наблюдения были подтверждены нашими исследованиями (табл. 4.2).

Содержание фукоидана в исследованных видах варьировало в широких пределах — от 3 до 25% в расчете на сухую биомассу (табл. 4.2). Минимальное количество полисахарида отмечено в вегетативной ткани *S. japonica* f. *diabolica* — 3,4%. Ранее также отмечалось, что дальневосточные представители порядка Laminariales весьма бедны фукоиданами, содержание которых в тканях водорослей в среднем колеблется от 0,3—1,0 до 3—4% от сухой биомассы (Норуа et al., 1999; Аминина и др., 2007; Усов, А. И. и др., 2001). Исключение составляют *S. cichorioides* и спорофиллы *A. fistulosa*, *A. marginata* и *U. pinnatifida*, содержание полисахарида в которых может достигать 11; 7,8; 6,7 и 16% от сухой массы, соответственно (Zvyagintseva et al., 2005; Усов, Смирнова и др., 2005; Усов и др., 2001; Skriptsova et al., 2010). В нашем исследовании массовая доля фукоидана у трех видов фукусовых водорослей варьировала в довольно широких пределах: от 7—9% от сухой биомассы у *S. pallidum*, что было сравнимо с содержанием полисахарида у проанализированных нами видов ламинариевых водорослей, до 25% у *S. babingtonii*.

Таблица 4.1

Общая характеристика проанализированных бурых водорослей

Вид	Систематическое положение	Проанализированная часть	Район сбора	Период сбора	Кол-во особей, каждой формы
<i>Saccharina japonica</i> f. <i>diabolica</i>	Laminariales, Laminariaceae	Вегетативные части растений и содержащие спороносное пятно	О-в Кунашир, Тихоокеанское побережье	Август 2008	5
<i>Saccharina japonica</i>	Laminariales, Laminariaceae	Стерильные и фертильные растения	Б. Соболев, зал. Петра Великого, Японское море	Август 2009	3
<i>Alaria ochotensis</i>	Laminariales, Alariaceae	Стерильные и фертильные спорофиллы	О-в Сахалин, Охотское море	Август 2008	не менее 10
<i>Fucus evanescens</i>	Fucales, Fucaceae	Стерильные и фертильные растения	О-в Кунашир, Охотское море	Август 2008	не менее 15
<i>Sargassum pallidum</i>	Fucales, Sargassaceae	Стерильные и фертильные растения	Б. Соболев, зал. Петра Великого, Японское море	Июль 2009	3
<i>Silvetia babingtonii</i>	Fucales, Fucaceae	Стерильные и фертильные растения	Рудная пристань, Японское море	Сентябрь 2009	не менее 15
<i>Costaria costata</i>	Laminariales, Costariaceae	Стерильные и фертильные растения	Б.Троица, зал. Петра Великого, Японское море	Май-июль 2006, 2007	не менее 15
<i>Undaria pinnatifida</i>	Laminariales, Alariaceae	Стерильные и фертильные спорофиллы	зал. Петра Великого, Японское море	Март-август 2000, 2001, 2006	не менее 15

Таблица 4.2

Характеристика водорастворимых полисахаридов, выделенных из некоторых видов бурых водорослей на разных стадиях их жизненного цикла

Водоросль	Содержание фукоидана, %	Нейтральные моносахариды, мольные %**						Содержание альгиновой кислоты, %
		Fuc	Gal	Man	Xyl	Glc	Rha	
<i>Saccharina japonica</i> , фертильное состояние	(6,60±0,83)	24,9	13,4	4,1	3,0	47,5	7,1	(17,54±0,66)
<i>Saccharina japonica</i> , стерильное состояние	(3,36±0,89)	40,7	13,9	11,9	8,1	14,2	11,1	(43,32±1,43)
<i>Alaria ochotensis</i> , спороносящие спорофилы	(8,04±0,69)	25,2	22,7	4,8	3,3	40,5	3,6	(36,04±3,40)
<i>Alaria ochotensis</i> , стерильные спорофилы	(5,94±0,92)	17,6	10,0	3,8	3,8	59,2	6,0	(23,69±1,21)
<i>Fucus evanescens</i> , фертильное состояние	(17,60±1,38)	76,6	4,9	2,8	5,1	10,2	0,5	(21,26±2,04)
<i>Fucus evanescens</i> , стерильное состояние	(10,21±0,65)	69,0	8,7	7,6	7,3	5,9	1,4	(20,70±2,42)
<i>Sargassum pallidum</i> , фертильное состояние	(8,69±0,59)	51,7	15,9	8,6	6,4	3,5	13,9	(31,56±0,42)
<i>Sargassum pallidum</i> , стерильное состояние	(6,92±0,26)	45,6	9,7	10,2	7,7	13,8	13,0	(28,59±1,31)
<i>Silvetia babingtonii</i> , фертильное состояние	(24,88±3,55)	79,9	6,2	3,6	5,7	3,6	1,0	(33,82±0,10)
<i>Silvetia babingtonii</i> , стерильное состояние	(16,16±1,60)	71,0	6,5	5,3	6,8	10,0	0,4	(27,61±2,05)

<i>Undaria pinnatifida</i> , спороносящие спорофилы	(15,0±1,60)***	53,5	42,8	2,7	0,3	0,7	0	(32,0±0,10)***
<i>Undaria pinnatifida</i> , стерильные спорофилы	(3,36±0,51)***	52,9	27,0	17,2	1,5	1,4	0	(21,3±0,42)***
<i>Costaria costata</i> , фертильное состояние	(28,3±)****	65,2	17,9	3,8	2,2	8,5	2,4	(20,6±0,6)
<i>Costaria costata</i> , стерильное состояние	(13,4±)****	47,4	13,1	18,2	6,4	2,2	13,2	(15,6±0,6)

*Результаты спектрофотометрического определения (Skriptsova A.V. et al., 2012), **Определение моносахаридного состава фракций ВЭЖХ после их полного кислотного гидролиза, ***% от веса сухой водоросли (Skriptsova A.V. et al., 2010), ****% от фракции водорастворимых полисахаридов (Имбс Т.И и др., 2009)

С целью изучения полисахаридного состава и структурных характеристик фукоиданов в зависимости от репродуктивного статуса водоросли был проведен анализ моносахаридного состава фракций, выделенных из вышеперечисленных водорослей. В гидролизатах общих фракций водорастворимых полисахаридов, экстрагированных из 5 образцов водорослей, преобладала фукоза, доля которой варьировала от 17% у *A. ochotensis* до 70–80 % у *F. evanescens* и *S. babingtonii* (табл. 4.2). В экстрактах из *A. ochotensis* и фертильных образцов *S. japonica* f. *diabolica* преобладала глюкоза, по мольной доле которой можно судить о содержании ламинарана в водорослях. Мольная доля глюкозы в этих водорослях достигала 40–59 и 14–47%, соответственно, тогда как у других исследованных видов эти значения не превышали 10%.

Ранее было высказано предположение, что развитие репродуктивных структур в водорослях оказывает существенное влияние на их полисахаридный состав (Имбс и др., 2009; Skriptsova et al., 2010). Сравнительный анализ показал, что содержание фукоидана в фертильных образцах всех исследованных видов было значительно выше, чем в стерильных, за исключением *S. pallidum*. Содержание фукоидана в этой водоросли, как и в вегетативных талломах, так и в слоевищах с развитыми рецептакулами значимо не различалось (табл. 4.2). Степень увеличения массовой доли фукоидана в тканях растений в период размножения зависела от вида водоросли. Так, если у *F. evanescens* и *S. japonica* f. *diabolica* содержание полисахарида в фертильных растениях (или частях растений для *S. japonica*)

было почти в 2 раза выше по сравнению со стерильными, то у *A. ochotensis* и *S. babingtonii* — лишь в 1,3 и 1,5 раза, соответственно (табл. 4.2). Моносахаридный состав водорастворимых полисахаридов при формировании репродуктивных структур (органов) также зависел от видовой принадлежности водорослей. Например, у обоих исследованных представителей сем. Fucaceae (*F. evanescens* и *S. babingtonii*) как стерильные, так и фертильные растения синтезировали относительно гомогенный фукоидан с преобладанием фукозы, доля которой при развитии генеративных структур (в генеративных растениях) менялась незначительно (табл. 4.2). Вегетативные особи трех других исследованных видов водорослей (*A. ochotensis*, *S. japonica* f. *diabolica* и *S. pallidum*) синтезировали более гетерогенный по моносахаридному составу фукоидан. Среди моносахаридов также доминировала фукоза (табл. 4.2). Сульфатированные полисахариды, выделенные из фертильных образцов *S. pallidum* и *A. ochotensis*, характеризовались более высоким содержанием галактозы и фукозы по сравнению со стерильными и фактически представляли собой галактофуканы. Для *S. japonica* f. *diabolica* — в образцах, содержащих генеративные ткани, фукозы и маннозы было меньше, чем в вегетативных тканях (табл. 4.2). Для всех исследованных видов характерно снижение доли маннозы в полисахариде с развитием репродуктивных структур (органов): в среднем содержание маннозы относительно фукозы уменьшалось в 1.5–3 раза (табл. 4.2).

Исследования сезонной динамики содержания и структурных характеристик фукоиданов, а также их изменения в зависимости от репродуктивного статуса водоросли были проведены в ТИБОХ на примере широко распространенных на Дальнем Востоке видов бурых водорослей *C. costata* и *U. pinnatifida* (порядок Laminariales).

C. costata — это однолетнее растение. В Приморье в мае-июне у этой водоросли появляется спороносная ткань, созревание зооспор водоросли завершается в июне-июле, затем происходит их рассеивание, и к августу слоевища водоросли разрушаются (Пржеменецкая (Макиенко), 1988).

В течение такого короткого вегетационного периода, а именно, с апреля по июль содержание фукоидана в *C. costata* увеличилось в 5 раз (рис. 4.1) (Имбс и др., 2009).

При этом изменялся моносахаридный состав фукоидана - от гетерофукана, состо-

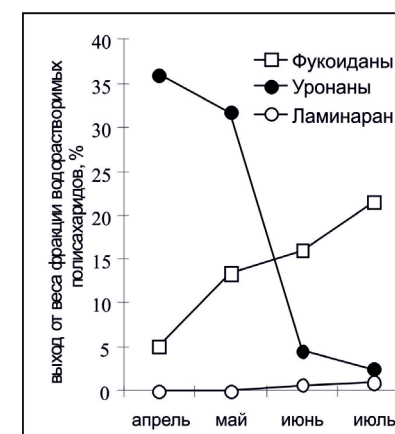


Рис. 4.1. Динамика содержания фукоидана, ламинарана и уронана в *C. costata* в зависимости от месяца сбора

ящего из фукозы, галактозы, маннозы и рамнозы (Fuc:Gal:Man:Rha = 1,0:0,3:0,4:0,2) в апреле—мае, до галактофукана в июне—июле (рис. 4.2). Содержание сульфатов в наблюдаемый период увеличилось более чем в 5 раз (рис. 4.2).

На примере *S. costata* было показано, что молекулярная масса фукоидана заметно уменьшается по мере созревания водоросли (рис. 4.3). Обнаруженная закономерность особенно интересна в связи с тем, что полисахариды с более низкой молекулярной массой предпочтительнее в качестве биологически активных веществ, т.к. их введение в организм высших животных вызывает меньше нежелательных эффектов (Kulicke et al., 1997). Оптимум молекулярных масс для биологически активных полисахаридов расположен в области невысоких значений от 10 до 100 кДа. Так, фукоиданы, проявляющие антикоагулянтную активность, имеют молекулярные массы от 50 до 100 кДа (Nagumo et al., 1996).

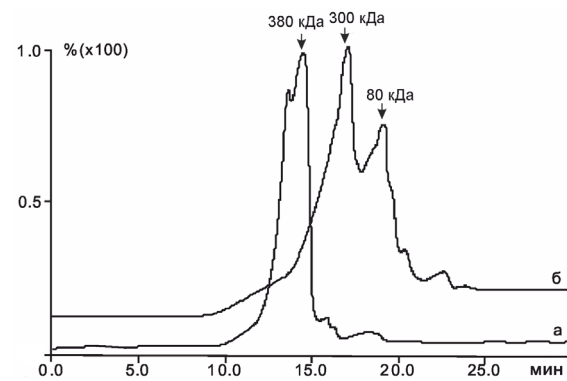


Рис. 4.3. Молекулярно-массовое распределение фукоиданов из майского (а) и июльского (б) образцов водоросли *S. costata*. Разделение фукоиданов проводили на последовательно соединенных колонках Shodex Asahipak GS-520 HQ и GS-620 HQ (7,5 × 300 мм)

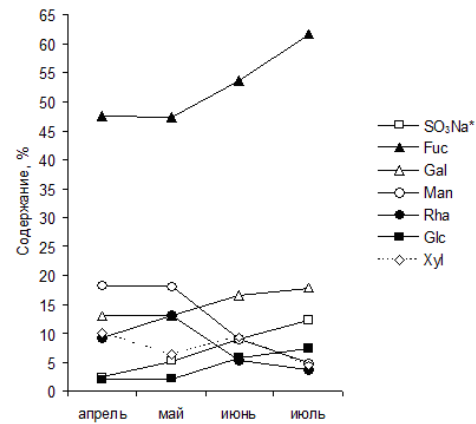


Рис. 4.2. Изменение моносахаридного состава (Fuc, Gal, Man, Rha, Xyl, Glc (% от суммы нейтральных моносахаридов)) и сульфатов (% от веса фракции) во фракциях водорастворимых полисахаридов водоросли *S. costata* в зависимости от месяца сбора

Аналогичные исследования были проведены для *U. pinnatifida* — водоросли, имеющей очень широкий ареал распространения. Эта водоросль, как и *S. costata*, характеризуется коротким вегетационным периодом. В отличие от *S. costata*, *U. pinnatifida* имеет морфологически разграниченные части таллома: вегетативную (пластина) и репродуктивную (спорофиллы) и, благодаря этому, служит удобным объ-

ектом для исследования физиологии и химического состава участков слоевища, выполняющих разные функции. Ранее для *U. pinnatifida* было показано, что во время роста с ней происходят значительные морфологические изменения: меняются весовые соотношения листовой пластины и спорофилл в целом талломе водоросли (Skriptsova et al., 2004). Листовая пластина составляет основную часть веса таллома в период с апреля по июнь. В период спороношения *U. pinnatifida* спорофиллы составляют до 76% от веса целого таллома водоросли. В литературе относительно состава и строения полисахаридов *U. pinnatifida* имеются разрозненные данные. Ранее из разных частей этой водоросли выделили фукоиданы различных структурных типов, которые показали разнообразную биологическую активность. Спорофиллы *U. pinnatifida* содержали преимущественно сульфатированные галактофуканы, в то время как целые талломы водоросли синтезировали смесь полисахаридов галактофуканового и аскофилланового структурных типов.

Нашими исследованиями было показано, что содержание фукоидана в *U. pinnatifida* с апреля по июль увеличилось в 5 раз, достигнув максимума к июлю, когда спорофиллы составляли основную часть таллома водоросли (рис. 4.4) (Skriptsova et al., 2010). При этом значительно изменился

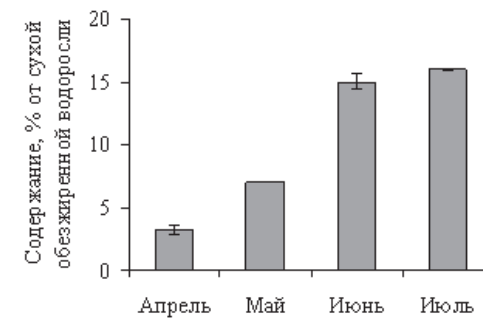


Рис. 4.4. Содержание фукоидана (% от сухой обезжиренной водоросли) в бурой водоросли *U. pinnatifida* в зависимости от месяца сбора

моносахаридный состав фукоидана: содержание Gal увеличилось, Man — заметно уменьшилось, а содержание Fuc практически не изменилось (рис. 4.5). Мольное отношение Fuc:Gal изменилось от 1,0:0,34 в апреле до 1,0:0,69 в июле. В апреле *U. pinnatifida* синтезировала гетерофукан, содержащий, помимо фукозы, примерно одинаковые количества маннозы и галактозы, а в июне—июле — фукоидан, представляющий собой галактофукан (рис. 4.5).

Таким образом, наибольшее количество фукоидана содержалось в июльском образце водоросли, когда спорофиллы составляли основную часть таллома. Изучение моносахаридного состава фукоидана *U. pinnatifida* показало, что в разные месяцы водоросль синтезировала фукоиданы различных структурных типов: в апреле—мае — сульфатированный гетерофукан, содержащий наряду с фукозой большие количества маннозы (до 30%) и галактозы (до 25%), в июне—июле — фукоидан, представля-

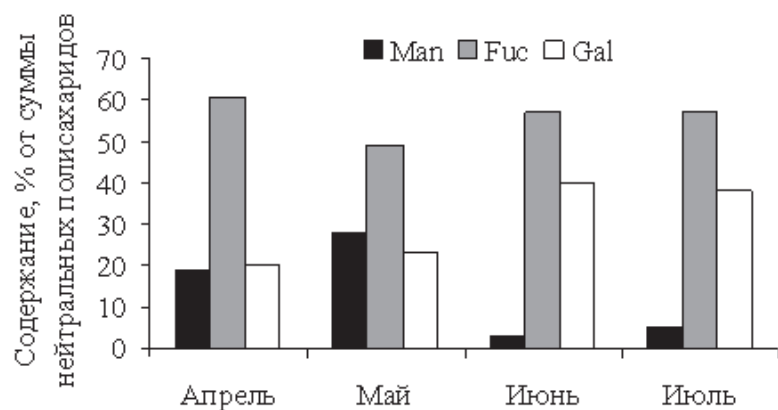


Рис. 4.5. Динамика моносахаридного состава фукоидана бурой водоросли *U. pinnatifida* в зависимости от месяца сбора

ющий собой сульфатированный галактофукан с содержанием маннозы не более 5–7%.

Изменения с апреля по июль в содержании и моносахаридном составе фукоидана водорослей *S. costata* и *U. pinnatifida* могут быть связаны как с изменениями внешних условий в течение года (температура, концентрация биогенных элементов, освещенность), так и с эндогенными причинами (рост, сопровождающийся морфологическими изменениями талломов, спороношение). Естественно было предположить, что основной причиной изменений в содержании и моносахаридном составе фукоидана водорослей *S. costata* и *U. pinnatifida* может быть формирование спорангиев, т.е. изменение репродуктивного статуса водоросли. Репродуктивный статус взрослых растений определяется наличием (фертильное состояние) или отсутствием (стерильное состояние) сорусов. В отличие от *S. costata*, у которой, как у большинства видов бурых водорослей порядка *Laminariales*, спорангии образуются на поверхности пластины, *U. pinnatifida* имеет спорофиллы — специализированный орган, где формируются и созревают споры, и который можно отделить от основного растения.

Июньские сборы водоросли *S. costata* содержали смесь фертильных и стерильных особей. Нами были отобраны талломы водоросли со зрелыми спорангиями и из них выделена фракция водорастворимых полисахаридов (ВП_{6ферт}). Фракция ВП_{6ферт} содержала самый высокий процент фукоидана по сравнению с фракциями ВП_{5ст} (стерильные особи) и ВП₆ (смесь фертильных и стерильных особей) (табл. 4.3). Анализ данных (табл. 4.3) показывает, что для *S. costata* имеется прямая связь между

повышением содержания фукоидана во фракции водорастворимых полисахаридов с формированием репродуктивных органов.

Таблица 4.3

Характеристика фракций водорастворимых полисахаридов (ВП) из *S. costata*, собранной в разные месяцы (май (5), июнь (6), июль (7)) и стадии жизненного цикла (фертильные (ферт) и стерильные (ст))

Фракция	Фукоидан, * %	SO ₃ Na*, %	Нейтральные моносахариды, мольные %					
			Fuc	Gal	Man	Rha	Xyl	Glc
ВП _{5ст}	13,4	5,3	47,4	13,1	18,2	13,2	6,4	2,2
ВП _{6ст/ферт}	16,0	9,0	53,6	16,6	9,1	5,4	9,3	6,0
ВП _{6ферт}	28,3	17,2	65,2	18,0	3,8	2,3	2,2	8,5
ВП ₇	21,5	12,3	61,7	17,9	4,8	3,7	4,4	7,4

* — % от веса фракции ВП.

Спорогенез *U. pinnatifida* в заливе Петра Великого начинается в конце мая, когда температура воды поднимается до 14°C (Skriptsova et al., 2010). В это время популяция *U. pinnatifida* состоит из фертильных и вегетативных взрослых (с развитыми спорофиллами) растений. Нами были отобраны взрослые растения с развитыми спорофиллами, но имеющие разный репродуктивный статус: фертильные, имеющие спорофиллы с развитыми сорусами, и вегетативные, спорофиллы которых не содержали парафиз или спорангиев. Из спорофилл этих растений были выделены фракции фукоиданов. В спорофиллах фертильных особей содержание фукоидана (15%) было в 5 раз выше, чем в вегетативных растениях (3%).

Сравнение моносахаридного состава фукоидана *S. costata*, полученного из образцов водоросли без сорусов (фракция ВП₅) и со зрелыми спорангиями (фракция ВП_{6ферт}) (рис. 4.6), показало, что при переходе *S. costata* к спороношению в полисахариде увеличилась доля фукозы и галактозы и значительно уменьшилась доля маннозы и рамнозы (с 18 до 4 мол% и с 13 до 2 мол%, соответственно). Мольное отношение моносахаридов Fuc:Gal:Man:Rha в фукоиданах, выделенных из вегетативного и генеративного растений, изменилось от 1,0:0,3:0,4:0,2 до 1,0:0,3:0,05:0,03, соответственно. Содержание сульфатов выросло в 3 раза (табл. 4.3). В

итоге можно сделать вывод, что фукоидан из *S. costata* со зрелыми спороангиями представляет собой сульфатированный галактофукан, тогда как вегетативные особи синтезируют фракции низкосульфатированных гете-

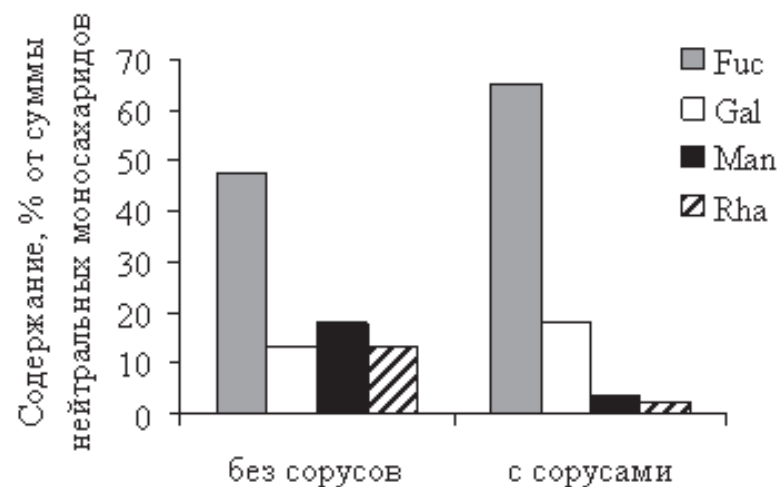


Рис. 4.6. Моносахаридный состав фукоидана из *S. costata* с сорусами и без сорусов

рополисахаридов, состоящих из рамнозы, маннозы, галактозы и фукозы.

В фукоидане из спорофилл *U. pinnatifida* также наблюдались изменения в составе нейтральных моносахаридов при переходе водоросли к

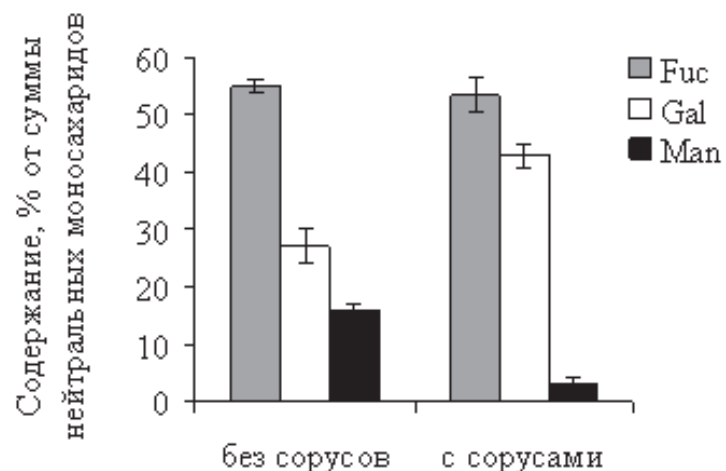


Рис. 4.7. Моносахаридный состав фукоидана из спорофилл *U. pinnatifida* с сорусами и без сорусов

спороношению (рис. 4.7).

Содержание маннозы уменьшилось практически в 5 раз (с 16 % в вегетативном до 3,4 % в генеративном растениях). С развитием сорусов в растениях в моносахаридной композиции увеличилось содержание галактозы (с 27 до 43 мол %), содержание фукозы не изменилось, поэтому мольное отношение Fuc:Gal изменялось от 1,0:0,51 в вегетативном до 1,0:0,80 в генеративном растениях. Таким образом, при переходе водоросли к спороношению моносахаридный состав фукоидана как в *S. costata*, так и в *U. pinnatifida* существенно изменяется: в вегетативных растениях содержатся преимущественно низкосульфатированные гетерополисахариды, построенные из маннозы, фукозы и галактозы, а в генеративных – высокосульфатированные полисахариды, состоящие, в основном, из галактозы и фукозы.

В целом полученные для водорослей *S. costata* и *U. pinnatifida* данные хорошо согласуются с результатами исследований, проведенных нами для других водорослей (Skriptsova et al., 2012): по мере созревания и развития сорусов содержание фукоидана в растениях увеличивалось до 5 раз; одновременно происходили существенные изменения в молекулярно-массовом распределении, моносахаридном составе, в результате фертильные растения синтезировали менее гетерогенный по моносахаридному составу фукоидан по сравнению с вегетативными особями (Имбс и др., 2009; Skriptsova et al., 2010). Общей структурной закономерностью для сульфатированных полисахаридов всех исследованных нами видов было увеличение в них доли фукозы и снижение доли маннозы при переходе водорослей из вегетативного в репродуктивное состояние, за исключением *S. japonica* f. *diabolica*. За счет этого уменьшалась гетерогенность моносахаридного состава.

Анализ собственных и литературных данных показывает, что увеличение содержания фукоидана и изменение его моносахаридного состава в процессе репродукции является общей закономерностью для бурых водорослей. Структурные перестройки полисахарида при спороношении, по-видимому, являются видоспецифичными. Изменение направленности биосинтеза сульфатированных полисахаридов при репродукции характерно также для красных водорослей (Yermak et al., 2006; Барабанова и др., 2005).

Увеличение содержания фукоидана с началом спороношения как у *S. costata*, так и у *U. pinnatifida*, равно как и у других исследованных бурых водорослей позволяет предположить, что фукоидан необходим для нормального функционирования спорообразующих тканей или фукоидан участвует в высвобождении спор. Изменение моносахаридного состава позволяет сделать вывод, что структура фукоидана также может быть связана с его физиологической ролью при развитии органов размножения

и/или выходе спор или гамет. Ранее было показано, что фукоиданы формируют слизистые «шапочки» спорангиев ламинариевых водорослей (Evans, 1973) и слизистые «пробки» в остиолах концептакулов *F. serratus* (Green, 1993). Гистохимически фукоиданы определяются как основной компонент внеклеточного матрикса (ВКМ) концептакулов. Концентрация этих полисахаридов в ВКМ концептакулов в десятки раз выше, чем в межклетниках сердцевины (Speransky et al., 1999; Speransky, 2001). Предполагается, что фукоиданы, благодаря их гигроскопичности, помогают высвобождению репродуктивных клеток (Evans, 1973). Согласно существующему мнению, одновременный выход гамет фукусовых водорослей обеспечивается мгновенным одновременным набуханием ВКМ концептакулов, что приводит к выталкиванию гамет (Paerson et al., 1988). Предполагается, что фукоиданы могут выступать как защитные агенты, особенно в репродуктивных органах, которые, как известно, являются наиболее чувствительными к негативному воздействию среды. Предположительно, благодаря своим антиоксидантным свойствам (Xue et al., 2001; Wang et al., 2008; Wang et al., 2010) фукоиданы в естественных условиях могут защищать растения от оксидативного стресса, вызванного флуктуациями температуры, света, солености и др. Предполагается также экранирующая функция фукоидана против высокой интенсивности света и ультрафиолетовой радиации (Holtkamp, 2009). Возможно, поэтому репродукция водорослей связана с изменением содержания, состава и строения их полисахаридов.

Приведенные выше факты позволяют утверждать, что накопление фукоидана при репродукции является общей закономерностью для бурых водорослей. Очевидно также, что в процессе спороношения происходят структурные изменения фукоиданов: моносахаридный состав становится менее гетерогенным, возможны также уменьшение молекулярной массы и увеличение степени сульфатирования синтезируемых водорослями фукоиданов. В итоге можно сделать вывод, что бурые водоросли, находящиеся в фертильном состоянии, синтезируют в больших количествах менее гетерогенный и более сульфатированный фукоидан по сравнению с вегетативным состоянием.

Принимая во внимание, что биохимический состав водорослей варьирует в зависимости от стадии жизненного цикла и экологических условий, изучение влияния эндо- и экзогенных факторов на содержание и структуру фукоиданов, установление закономерностей их изменений, определение физиологического периода, когда водоросль синтезирует фукоидан, обладающий постоянными структурными характеристиками и определенной биологической активностью, имеет практическое значение. Подобные исследования необходимы

для определения оптимальных сроков сбора водорослей с целью стандартизации препаратов полисахаридов, поскольку стандартизация — неперенное условие для создания БАД или лекарств на основе новых соединений.

Глава 5. Технологии переработки бурых водорослей

Бурые водоросли составляют основу растительности морей России, запасы их огромны, число видов водорослей превышает полторы тысячи, и являются основным источником органического вещества в прибрежной зоне наших морей. Водоросли этого отдела включают наибольшее количество промысловых и потенциально промысловых видов, важнейшими из которых являются ламинариевые и фукусовые. Вовлечение водорослей в переработку требует глубоких знаний о химическом составе используемого сырья. По своему химическому составу бурые водоросли значительно отличаются от водорослей других отделов и наземных растений. Они содержат уникальные по структуре и биологическому действию соединения, среди которых важное место занимают полисахариды: ламинараны (1,3;1,6-β-D-глюканы), альгинаты (сополимеры маннуроновой и гулууроновой кислот) и фукоиданы (высокосульфатированные гомо- и гетерополисахариды). Существенный вклад в положительное влияние бурых водорослей на организмы вносят именно полисахариды — альгиновые кислоты как энтеросорбенты, ламинараны как иммуномодуляторы и антиопухолевые агенты и фукоиданы как антикоагулянты, иммуномодуляторы, противовирусные, антибактериальные и антиопухолевые агенты. При получении из водорослей продуктов питания или широко используемой альгиновой кислоты, ламинараны и фукоиданы попадают в отходы производства. Учитывая огромные запасы бурых водорослей и их видовое разнообразие, они все чаще рассматриваются как потенциально важный источник этих биологически активных соединений.

Известно, что качественный состав бурых водорослей достаточно стабилен, однако в количественном отношении он значительно изменяется от одной таксономической группы родов к другой, а в пределах одного рода — от вида к виду. Даже в пределах одного и того же вида количественный состав химических веществ водорослей зависит от многих факторов: возраста, физиологического состояния, условий обитания, сезона сбора и пр. (см. главу 4). Поэтому при организации переработки бурых водорослей с целью получения лечебных или лечебно-профилактических препаратов, необходимо использовать достаточно гибкие технологические схемы, позволяющие извлекать все ценные компоненты из бурых водорослей с учетом большой вариабельности их состава.

Способы выделения и очистки полисахаридов из бурых водорослей

В основе существующих способов переработки бурых водорослей лежат экстракционные технологии, усовершенствование которых позволят расширить список существующих в настоящее время извлекаемых природных соединений, их чистоту и количество. В настоящее время для переработки бурых водорослей применяют две технологические схемы. Первая основана на экстракции веществ водоросли водными растворами, вторая включает в себя последовательность экстракций органическими растворителями и водными растворами. Для выделения основных компонентов бурых водорослей — полисахаридов используют, в основном, экстракцию водными растворами в следующей последовательности: свежие водоросли после промывки опресненной водой сушат и измельчают для более эффективного экстрагирования. Водорастворимые полисахариды экстрагируют из водоросли горячей (Nishino. et al., 1989) или холодной водой (Hemmingson et al., 2006), водными растворами кислот при комнатной или повышенной температурах (Ponce et al., 2003; Имбс и др., 2009), 2% водным раствором хлорида кальция (Finch et al., 1986; Bilan et al., 2006; Билан и др., 2007). Из остатка водоросли альгиновые кислоты в виде солей извлекают раствором соды (Облучинская, 2002). Предложен способ экстракции фукоиданов водным этанолом в концентрациях до 50% (Облучинская, Воскобойников и др., 2002). Для облегчения экстракции полисахаридов используют протеолитические ферменты (Rocha et al., 2005; Silva et al., 2005). Экстракты, полученные с помощью перечисленных экстрагентов, как правило, содержат смесь полисахаридов (ламинараны, фукоиданы, альгинаты), а также низкомолекулярные вещества (пигменты, фенольные соединения, маннит, олигосахариды, белки и минеральные вещества). В некоторых работах показана возможность фракционирования фукоиданов, имеющих различное строение полисахаридной цепи, на стадии экстракции, используя различные технологические режимы (Ponce et al., 2003; Имбс и др., 2009). На количественный выход и однородность фракций полисахаридов кроме рН среды, влияют температура, время и кратность экстрагирования (Пономарев, 1976). Как правило, интенсификация процесса экстракции приводит к повышению выхода экстрактивных веществ и одновременно снижению селективности экстракции.

Химическая природа экстрагента в значительной мере определяет химический состав и выход экстрактивных веществ, поэтому значительная доля исследований связана с расширением круга используемых экстрагентов — выявлением различий в составе веществ в зависимости от природы используемых экстрагентов или их смесей, а также от последовательности

их воздействия на водоросли. Немаловажными характеристиками потенциального экстрагента служат рентабельность (доступность и стоимость, возможность его регенерации) и экологичность (допустимость контакта потребительских продуктов, содержащих остатки экстрагента, с живыми организмами, охрана труда на производстве).

Для получения при водной экстракции более чистых фракций полисахаридов рядом авторов предложена предварительная обработка водорослей органическими растворителями: 80–85%-ным водным этанолом (Percival et al., 1983; Nagaoka et al., 1999) или 85%-ным водным метанолом (Dobashi et al., 1989), или смесью хлороформ-метанол-вода (2:4:1) (Bilan et al., 2006; Bilan et al., 2002), или последовательно смесью хлороформ-метанол-вода и 80%-ным водным этанолом (Chizhov et al., 1999), или смесью метилхлорида с этанолом (Облучинская, 2004). Такая обработка водорослей позволяет эффективно извлекать как полярные, так и неполярные низкомолекулярные вещества, но оставлять не извлеченными биополимеры. Информация о составе водно-этанольных экстрактов некоторых видов бурых водорослей имеется в работах (Имбс и др., 2009; Репина, 2005; Коровкина, 2007). Низкомолекулярные вещества почти полностью можно извлекать, обрабатывая водоросли последовательно водным этанолом и водным формальдегидом (Хотимченко и др., 2001, Пат. РФ 2135518). В результате использования последнего, пигменты остаются связанными с белково-целлюлозно-формалиновым комплексом (Барашков, 1972), однако, в последние годы санитарные власти запретили сброс в канализацию и прибрежные воды стоков, содержащих формальдегид.

Таким образом, в результате предварительной обработки водорослей растворами органических растворителей можно получить суммарные экстракты биологически активных веществ разного химического состава. Последующей экстракцией водой и/или водными растворами кислот и щелочей можно извлекать из водоросли полисахариды. В целом, на основе экстракционных технологий получают многокомпонентные композиции биологически активных веществ с ненормируемым составом. Одновременно с развитием экстракционных подходов фракционирования экстрактов, содержащих полисахариды и низкомолекулярные вещества, и технологии тонкой очистки индивидуальных полисахаридов.

Для выделения полисахаридов из водных растворов используют метод многократного осаждения этанолом. Этот метод позволяет очищать растворы полисахаридов от балластных веществ. Потери целевых компонентов при использовании этого метода достигают

30%. Очистить растворы полисахаридов от балластных веществ можно методом диализа или электродиализа через целлофановую полупроницаемую мембрану. Процесс диализа обычно протекает при комнатной температуре в течение длительного времени от 12 часов до 3 суток (Усов и др., 2001). Использование метода ультрафильтрации позволяет одновременно проводить диализ и концентрирование водных растворов полисахаридов (Пат. РФ 2240816). Разделение ламинарана и фукоидана проводят либо осаждением фукоидана в виде комплексов его с цетавлоном (Bilan et al., 2002), либо ступенчатым осаждением полисахаридов разными объемами этилового спирта.

Разделение водных растворов фукоиданов и ламинарана проводят также с помощью гидрофобных сорбентов, таких как «Полихром 1» (политетрафторэтилен), на которых сорбируется ламинаран, а полианионные полисахариды остаются в растворе (Zvyagintseva et al., 1999). В некоторых случаях возможно разделение ламинаранов и фукоиданов и фракционирование последних дробным осаждением полисахаридов этиловым спиртом разной концентрации в присутствии поливалентных металлов (Bernardi, Springer, 1962). В ряде случаев ступенчатое растворение осадка позволяет затем получить фракции фукоиданов, различающиеся по химической структуре (Ponce et al., 2003).

Известно, что даже один вид водоросли может содержать несколько структурных типов сульфатированных полисахаридов (Bilan et al., 2010). Для выделения более однородных по заряду фракций используют анионообменную хроматографию. Этот метод используют также для разделения фукоидана и ламинарана. Наиболее популярными анионитами служат ДЭАЭ-сефадекс (Chizhov et al., 1999), ДЭАЭ-сефацель (Bilan et al., 2002), ДЭАЭ-целлюлоза (Шевченко и др., 2007) и ДЭАЭ-сефароза (Hemmingson et al., 2006). Водорастворимые альгинаты можно высадить из экстрактов раствором хлорида магния в этиловом спирте (Medcalf, Larsen, 1977) или подкислением экстрактов (Шевченко и др., 2007).

Очевидно, что для успешных структурных и фармакологических исследований необходимо получать однородные по составу фракции фукоидана.

Ранее были предложены условия для наиболее полного извлечения фукоидана из *Silvecia canaliculata* и *Fucus vesiculosus* раствором соляной кислоты (Black, 1952), а также из *Ecklonia kurome* горячей водой (Nishino, 1989). Усов с соавторами предложили дополнительно фракционировать полисахариды на стадии выделения (Усов, Чижов, 1989). Как правило, в большинстве работ определяли влияние условий экстракции на общий выход фукоидана, и лишь некоторые исследователи учитывали изменение структурных характеристик фукоидана

при изменении условий экстрагирования (Ponce et al., 2003).

Влияние технологических режимов на структурные характеристики продемонстрированы на примере экстракции и очистки фукоидана из бурых водорослей *Costaria costata* и *F. evanescens* (Имбс и др., 2009). Свежезаготовленные водоросли июльского сбора предварительно экстрагировали этанолом, затем остаток водоросли последовательно экстрагировали 3 часа раствором соляной кислоты (pH 2) при 20°C (холодная экстракция, фракции F1), и при 60°C (горячая экстракция, фракции F2). Из предварительных исследований известно, что *F. evanescens* отличается более высоким содержанием фукоидана по сравнению с представителями порядка Laminariales, поэтому провели дополнительную горячую экстракцию при 60°C в течение 12 часов (фракция F3). Характеристика полученных фракций фукоиданов приведены в таблице 1.

Для *C. costata* (Cc) выход фракций фукоидана CcF1, полученной при 20°C, был примерно в 2 раза выше, чем фракции CcF2, полученной при 60°C. Для *F. evanescens* (Fe), напротив, наибольший выход был получен при горячей экстракции. Было отмечено высокое содержание уронанов и пониженное содержание белка во фракции F2 для обеих водорослей. По моносахаридному составу и содержанию сульфатных групп фракции фукоиданов FeF1 и FeF2 были очень близки (табл. 5.1).

Таблица 5.1

Характеристика фракций фукоиданов, выделенных из водорослей *C. costata* и *F. evanescens* раствором соляной кислоты (pH 2) последовательно при 20°C (F1) и 60°C (F2 и F3)

Показатели	Водоросли				
	<i>C. costata</i>		<i>F. evanescens</i>		
Фракция	CcF1	CcF2	FeF1	FeF2	FeF3
Выход, %*	2,5	0,9	2,5	5,1	1,2
Уроновые кислоты, %**	2,2	5	0,3	5,0	54,8
Фукоидан, %**	27,4	17,4	65,0	89,7	15,8
Сульфаты, %**	17,0	12,3	22,7	21,8	8,1
Белок, %	3,1	2,5	9,2	6,3	2,6
Mw, кДа	80-560	30-240	820	840	Н.о.

Нейтральные моносахариды (мольные %)	Fuc	58,2	72,7	86,3	86,0	60,8
	Gal	20,0	15,7	4,7	6,0	3,3
	Man	1,8	6,8	1,5	1,5	26,0
	Rha	4,2	1,4	0	0	0
	Xyl	4,1	1,7	1,2	1,6	6,0
	Glc	11,7	1,6	6,3	4,9	3,9

* — % от веса сухой обезжиренной водоросли; ** — % от веса фракции.

Таким образом, из *F. evanescens* при разных температурах были выделены сульфатированные фуканы (фракции FeF1 и FeF2), практически не отличающиеся по моносахаридному составу, содержанию сульфатов и молекулярным массам. Аналогичные сульфатированные фуканы из этой водоросли были выделены ранее при 85°C (продолжительность экстракции 5 часов) (Bilan et al., 2002) и при 60°C (продолжительность экстракции 5 часов) (Zvyagintseva et al., 2003). Дополнительной экстракцией с небольшим выходом была получена фракция фукоидана FeF3 с высоким содержанием маннозы (26% от суммы нейтральных моносахаридов) и уроновых кислот (50% от фракции) (табл. 5.1). Наличие глюкозы в составе моносахаридов указывало на присутствие во фракциях F1 и F2 ламинарана. Можно отметить, что исходное содержание ламинарана в обеих водорослях невелико.

Фракцию FeF1 из *F. evanescens* разделяли дробным осаждением этанолом на фукоидан (FeF1-f) и ламинаран (FeF1-l), характеристика фракций представлены в таблице 5.2. Доля глюкозы в моносахаридном составе фракции FeF1-f в результате дробного осаждения уменьшилась в 3,9 раза и возросла доля фукозы. Ранее было показано, что ламинаран из *F. evanescens* представляет собой 1,3;1,6-β-D-глюкан с очень высоким содержанием β-1,6-связанных (до 35%) остатков глюкозы (Звягинцева и др., 1994).

Таблица 5.2

Характеристика фукоидана (FeF1-f) и ламинарана (FeF1-l), полученных осаждением этанолом из фракции FeF1, выделенной из *F. evanescens* экстракцией при 20°C

Фракция	FeF1	FeF1-f	FeF1-l
Выход, %*	2,5	1,7	0,7
Уронаны, %**	0,3	0,7	н.о.

Фукоидан, %**	65,0	73,4	н.о.
Сульфаты, %**	22,7	23,0	н.о.
Нейтральные моносахариды (мольные %)	Fuc	86,3	91,0
	Gal	4,7	4,6
	Man	1,5	1,4
	Rha	0	0
	Glc	6,3	1,6
	Glc	6,3	1,6

* — % от веса сухой обезжиренной водоросли; ** — % от веса фракции, н.о.- не определяли

Сравнительный анализ полисахаридов фракций СсF1 и СсF2, выделенных из *C. costata* последовательно при 20°C и при 60°C показал, что фракция СсF1 из *C. costata* содержала значительную долю глюкозы по сравнению с фракцией СсF2. Можно предположить, что почти весь ламинаран извлекался из *C. costata* при холодной экстракции (табл. 5.1).

Молекулярно-массовое распределение фукоиданов во фракциях СсF1 и СсF2 из *C. costata* было неоднородным и находилось в интервале от 20 до 600 кДа с главным максимумом при 300 кДа и двумя пиками меньшей интенсивности с максимумами при 80 и 560 кДа. Фракция СсF2 содержала полисахариды с меньшей молекулярной массой, с максимумом при 70 кДа. Определение молекулярной массы полисахаридов выполняли методом ВЭЖХ. Разделение фукоиданов проводили на последовательно соединенных колонках Shodex Asahipak GS-520 HQ и GS-620 HQ (7,5 мм x 300 мм) при 50°C, элюируя H₂O (0,8 мл/мин). Колонки калибровали, используя как стандарты пуллуланы с молекулярными массами от 180 до 667000 Да и голубому декстрану.

Сравнительная оценка содержания сульфатных групп в фукоиданах СсF1 и СсF2 проводилась путем сравнения величин отношений значений интенсивностей валентных колебаний при 1260–1264 см⁻¹ (O=S=O группы) и при 1082 см⁻¹ (углеродный скелет сахарного кольца) относительно локальной базовой линии в области 1580–880 см⁻¹ (рис. 5.1). Сравнение полученных величин (0,92 и 0,67 соответственно) показало, что содержание сульфатных групп во фракции СсF1 было на 25% больше, чем во фракции СсF2, т.е. при холодной экстракции был получен более сульфатированный фукоидан. Кроме того, фракция фукоиданов (СсF2) содержала меньше Gal, но больше Man, чем фракция СсF1 (табл. 5.1).

При последовательной экстракции *C. costata* были получены фракции фукоиданов разные по составу и молекулярной массе. Тогда как анало-

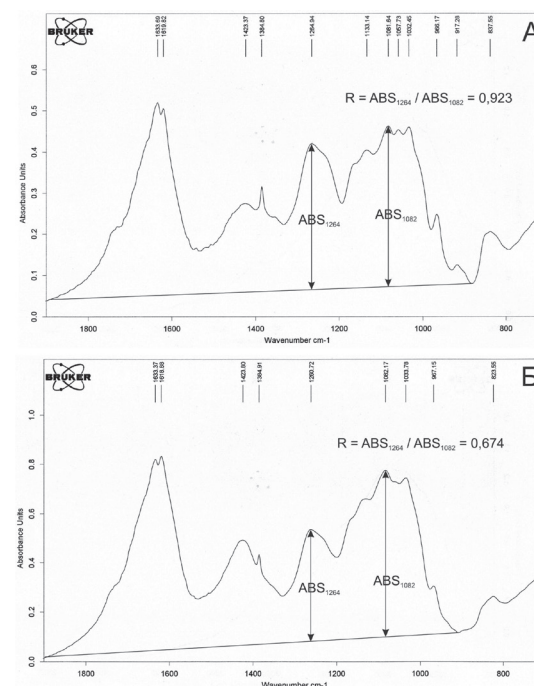


Рис. 5.1. ИК-спектры фракций СсF1(А) и СсF2(Б), выделенных из *C. costata* экстракцией при температуре 20 и 60°C соответственно

гичные фракции фукоиданов FeF1 и FeF2 из *F. evanescens* практически не различались (табл. 5.1). Интересно отметить, что, при дополнительном экстрагировании *F. evanescens* в более жестких условиях (60°C, 12 ч) была получена фракция фукоидана FeF3, свойства которой (высокое содержание альгиновых кислот и значительная доля Man в составе моносахаридов, низкое содержание сульфатов) были близки к свойствам фракции СсF2 из *C. costata* (табл. 5.1). Возможно, фракции фукоиданов СсF2 и FeF3 извлекаются при разрушении клеточных стенок, причем для *F. evanescens* этот процесс требует более жестких условий. Была показана возможность фракционирования фукоиданов, используя разные технологические режимы экстракции. При комнатной температуре из *C. costata* экстрагировали преимущественно галактофуканы, а из *F. evanescens* — сульфатированные фуканы. При более жестких условиях экстракции (60°C) из *C. costata* выделили фукоидан преимущественно аскофилланового строения. Для *F. evanescens*, имеющего более жесткий таллом, фукоидан аскофилланового строения был получен при экстрагировании в течении 12 часов при 60°C (фракция FeF3).

Приведенные примеры показали, что технологии выде-

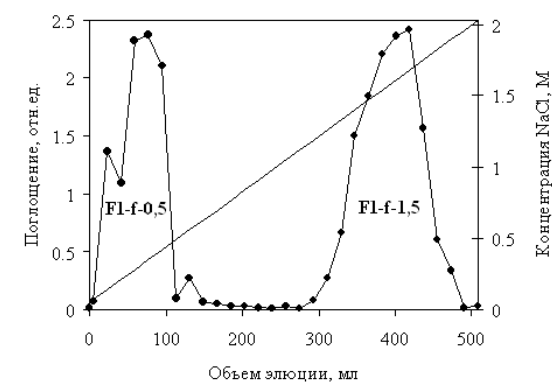


Рис. 5.2. Хроматография фракции СсF1-f на DEAE-целлюлозе (3,5 × 14 см) линейным градиентом H₂O- 2M NaCl

ления водорастворимых полисахаридов из водорослей разных порядков должны быть индивидуальными.

Для дальнейшей детальной характеристики состава полисахаридов фракцию СсF1, выделенную из *C. costata* холодной экстракцией, очистили гидрофобной хроматографией на ПХ-1 от примеси ламинарана, получили фракция СсF1-f, которую дополнительно фракционировали ионообменной хроматографией на DEAE-целлюлозе. Сорбированные на DEAE-целлюлозе полисахариды элюировали линейным градиентом H₂O—2М NaCl (рис. 5.2). Получили подфракции СсF1-f-0,5 и СсF1-f-1,5, характеристика этих фракций приведена в таблице 5.3.

Таблица 5.3

Характеристика подфракций СсF1-f-0,5 и СсF1-f-1,5, полученных хроматографией на DEAE-целлюлозе фракции фукоидана СсF1-f из

C. costata

Фракция		СсF1-f	СсF1-f-0,5	СсF1-f-1,5
Выход, %*		100	29	69
Mw, кДа		80—800	20—200, 200—800	40—600
Fuc/ Gal		1/0,27	1/0,28	1/0,28
Na SO ₃ ⁻ %*		17,3	6,7	23,8
Моносахариды (мольные %)	Fuc	55,1	22,6	70,2
	Gal	18,1	6,4	19,8
	Man	9,2	37,0	7,0
	Rha	11,5	4,2	0
	Xyl	4,3	4,6	0
	Glc	1,8	9,6	0
	GlcA	н.о.	15,5	3,0

* — % от веса фракции фукоидана; н.о. — не определяли.

Подфракция СсF1-f-0,5 содержала низкосульфатированный гетерогенный по моносахаридному составу фукоидан с высоким содержанием маннозы и глюкуроновой кислоты (табл. 5.3). В этой подфракции присутствовали примерно в равных количествах фукоиданы с молекулярными массами от 20 до 200 и от 200 до 800 кДа (рис. 5.3).

Высокосульфатированная подфракция СсF1-f-1,5 составляла около 70% от исходного фукоидана (СсF1-f) (табл. 5.3). Около 90% от суммы моносахаридов этой подфракции были представлены Fuc и Gal в соотношении 1,0:0,28. Основную часть подфракции СсF1-f-1,5 составили фукоиданы со средней молекулярной массой 160 кДа, в меньшем количестве — 70 кДа.

Следовательно, фракция СсF1 содержала, как минимум, фукоиданы двух структурных типов — слабозаряженный уронофукоманнан и высокосульфатированный галактофукан в весовом соотношении 1:2.

Наличие различных структурных типов в составе общих фракций фукоиданов было отмечено для других видов водорослей. При фракционировании сульфатированного полисахарида, выделенного из *F. vesiculosus* (Sigma), авторы получили фукоиданы различного строения. Как основной компонент был выделен типичный фукоидан, содержащий только сульфатированную фукозу, как минорный компонент — низкосульфатированный гетерополисахарид, содержащий кроме фукозы другие моносахариды и высокий процент уроновых кислот (Nishino et al., 1994, Fitton, 2005).

При экстрагировании водоросли *Adenocytis utricularis* раствором соляной кислоты при 20°C получили галактофукан, который показал высокое ингибирующее действие против вирусов герпеса HSV-1 и HSV-2. Продукты экстракции при температуре 70°C содержали уронофукан, который противовирусной активности не проявлял. Фракция уронофукана, кроме фукозы, характеризовалась высоким содержанием уроновых кислот и маннозы, другие моносахариды находились в ней в минорных количествах. Фракция отличалась сравнительно низкими молекулярными массами (Ponce et al., 2003). Hemmingson с соавторами (Hemmingson et al., 2006) выделили из *Undaria pinnatifida* (цельное растение, в котором спорофиллы составляли 30% от общего веса) при комнатной температуре с выходом 4,5% суммарный полисахарид, который показал высокое ингибирующее действие против вирусов герпеса HSV-1 и HSV-2. При фракционировании полисахарида ионообменной хроматографией были получены 2 фракции F1M и F2M в соотношении 1,0:3,5, которые показали разное противовирусное действие. Более сульфатированная фракция галактофукана (F2M) показала высокое ингибирующее действие

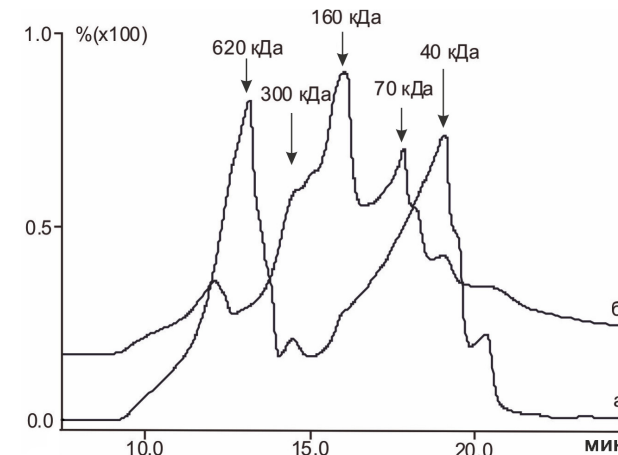


Рис. 5.3. Молекулярно-массовое распределение подфракций СсF1-f-0,5 (а) и СсF1-f-1,5 (б) фукоидана из водоросли *C. costata*. (Колонки (7,5 мм x 300 мм) Shodex Asahipak GS-520 HQ и GS-620 HQ)

против вируса герпеса HSV-1, практически аналогичное исходному образцу. Авторами также было установлено, что полисахарид продолжал показывать высокую активность против вируса герпеса HSV-1 при соотношении фракций F1M и F2M как 1:3, так и 1:1. При изменении соотношения фракций, равное 3:1, ингибирующее действие смеси полисахаридов против вируса герпеса HSV-1 уменьшилось вдвое.

Оптимизация условий выделения фукоиданов из дальневосточной бурой водоросли *Fucus evanescens*

Извлечение веществ из растительного сырья является сложным физико-химическим процессом, на протекание которого влияют несколько факторов. При разработке технологии необходимо определять оптимальные условия для экстракции с максимальным выходом однородного по составу продукта.

Оптимизацию условий экстракции фукоидана проводили на примере бурой водоросли *F. evanescens*. В дальневосточных морях эта водоросль является наиболее перспективным сырьем для получения фукоидана, представляющего собой сульфатированный фукан. В качестве сырья использовали сухую, предварительно обработанную органическими растворителями, водоросль, которая содержала до 14% фукоидана (далее по тексту – сырье).

В предварительных экспериментах были выбраны следующие условия экстракции фукоидана из сырья: средний размер частиц сырья – 5 мм, кислотность экстракционной среды pH 2,5, отношение водоросль: экстрагент – 1:15, температура – 50°C, кратность экстракций – 2 (Имбс и др., 2012). Для проверки степени влияния каждого из этих факторов на процесс экстракции фукоидана был проведен оптимизационный эксперимент по типу дробной реплики с двумя уровнями пяти переменных (2^{5-2}) с определяющими контрастами (Пономарев, 1976). Задача оптимизации сводилась к определению значений условий экстракции, обеспечивающих максимальный выход фукоидана и минимальное содержание сопутствующих веществ. План и результаты факторного эксперимента приведены в таблице 5.4.

Таблица 5.4

План и результаты факторного эксперимента (с двумя уровнями пяти переменных) по оптимизации экстракции фукоидана из *F. evanescens*

№ опыта	Факторы эксперимента						Y ₁ , %	Y ₂ , %	Y ₃ , %	Y ₄ , %
	X ₀	X ₁ , pH	X ₂ , раз	X ₃ , ч	X ₄ , °C	X ₅ , мм				
1	1:15	1,5	3	2	65	2	78,0	27,4	45,1	88,4

2	1:15	3,5	3	2	35	8	55,6	21,9	76,9	46,0
3	1:15	1,5	1	2	35	8	46,0	14,9	69,2	62,0
4	1:15	3,5	1	2	65	2	44,2	15,0	76,4	54,0
5	1:15	1,5	3	4	35	2	52,6	21,2	46,8	74,2
6	1:15	3,5	3	4	65	8	94,8	26,4	93,4	54,0
7	1:15	1,5	1	4	65	8	70,0	19,5	65,9	76,0
8	1:15	3,5	1	4	35	2	35,2	13,1	84,8	44,2
9	1:15	2,5	2	3	50	5	49,0	19,4	64,1	56,4
10	1:15	2,5	2	3	50	5	62,0	18,4	70,3	67,4
11	1:15	2,5	2	3	50	5	48,0	20,6	54,7	60,0
12	1:15	2,5	2	3	50	5	50,0	19,4	65,0	57,0

Выход процесса Y_i (функция отклика) определяли, как Y₁ – выход фукоидана (% от содержания в сырье); Y₂ – выход экстрактивных веществ (% от веса сырья); Y₃ – выход водорастворимых полисахаридов (% от веса экстрактивных веществ); Y₄ – выход фукоидана (% от веса водорастворимых полисахаридов). Независимыми переменными (X_i) были: X₀ – соотношение сырье: экстрагент; X₁ – значение pH; X₂ – кратность экстракции, раз; X₃ – продолжительность экстрагирования, ч; X₄ – температура, °C; X₅ – степень измельчения сырья, мм.

Для определения ошибки эксперимента было поставлено 4 опыта в нулевых условиях (опыты 9-12, табл. 5.4).

По результатам факторного эксперимента описание функции отклика в виде линейных уравнений регрессии имели вид:

$$Y_1 = 59,6 - 2,1 X_1 + 10,7 X_2 + 5,8 X_3 + 9,9 X_4 + 7,1 X_5 \quad (1)$$

$$Y_2 = 19,9 - 0,8 X_1 + 4,3 X_2 + 0,6 X_3 + 1,7 X_4 + 0,8 X_5 \quad (2)$$

$$Y_3 = 69,8 + 13,1 X_1 + 4,3 X_2 + 0,8 X_3 + 2,5 X_4 + 6,5 X_5 \quad (3)$$

$$Y_4 = 62,4 - 12,8 X_1 + 3,3 X_2 + 2,2 X_3 + 3,3 X_4 - 2,8 X_5 \quad (4)$$

Проверка значимости коэффициентов при факторах X_i в уравнениях (1-4) по критерию Стьюдента (с надежностью 95%) показала, что в уравнении (1) и (2) значимо отличны от нуля только коэффициенты при X₂, X₄ и X₅, а в уравнениях (3) и (4) – при X₁.

Это означает, что в выбранном диапазоне величин факторов увеличение кратности (X₂) и температуры экстракции (X₄) должно приводить к увеличению выхода фукоидана (Y₁) и экстрактивных веществ (Y₂). При увеличении pH среды (X₁) следует ожидать повышения доли полисахаридов в экстрактивных веществах (Y₃) и уменьшения доли фукоидана во фракции полисахаридов (Y₄). Поскольку уменьшение размера частиц сы-

рья (X_5) при статическом режиме экстракции не приводило к повышению выхода фукоидана, рекомендовано сырье измельчать до размера 1–3 см.

Как показали результаты регрессионного анализа уравнения (1), оно удовлетворительно описывает выход фукоидана в процессе экстракции. Экспериментальная проверка модели в условиях иных, чем те, которые использовались для получения уравнения (1), подтвердила адекватность ее применения для описания процесса ($F_{\text{эксп.}} = 5,42$; $F_{\text{табл.}} = 5,79$; $p = 0,05$).

Для масштабирования процесса экстракции фукоидана из *F. evanescens* необходимо учитывать следующие закономерности. На выход фукоидана положительно влияло повышение температуры экстракции. Однако, учитывая, что экстрагирование проводят при достаточно низких значениях pH, повышение температуры выше 70°C может привести к частичному кислотному гидролизу фукоидана. Увеличение кратности экстрагирования также положительно влияло на выход фукоидана. Изменение pH в заданном интервале (1,5–3,5) влияло на выход фракции водорастворимых полисахаридов и содержание фукоидана в этой фракции. Варьируя значение pH от 1,5 до 3,5 и выше можно получать фракцию полисахаридов с разным содержанием фукоидана и альгината. Для получения фракции полисахаридов, обогащенной фукоиданом, экстракцию следует проводить при pH 2,0–2,5.

Была проведена 3-х кратная экстракция сырья при 65°C, результаты опыта приведены в таблице 5.5. Составы 1 и 2 экстрактов практически идентичны и их следует объединить. При необходимости получения гетерогенного фукоидана можно проводить 3-ю экстракцию, выход которой составляет 12% от суммарного выхода.

По результатам оптимизации были выбраны условия экстракции фукоидана: pH 2,5; при 65±5°C; кратность экстракции два раза по 3 ч, гидромодуль 1:15; при этом содержание фукоидана в сумме экстрактивных веществ составило от 40 до 50%.

Для очистки фукоидана *F. evanescens* от ламинарана и низкомолекулярных примесей использовали ультрафильтрацию на мембранах с пределом удерживания 5 кДа. Одновременно с очисткой экстракта происходило его концентрирование. Конечный продукт получали осаждением фукоидана из концентрата этиловым спиртом. Характеристика экстрактов приведена в таблице 5.6. В результате очистки был получен препарат, содержащий 86,7% фукоидана (табл. 5.6).

Таблица 5.5

Характеристика экстрактов, выделенных из *F. evanescens* (pH 2,5; 65°C; 3 часа)

Характеристики	Ступени экстракции			
	1-й экстракт	2-й экстракт	3-й экстракт	
Выход, %*	6,3	3,3	1,3	
Уронаны, %**	2,8	5,0	20,0	
Фукоидан, %**	65,0	89,7	55,7	
Сульфаты, %**	22,7	23,2	15,0	
Нейтральные моносахариды (мольные %)	Fuc	86,3	85,8	79,6
	Gal	4,7	4,9	4,2
	Man	1,5	1,3	9,0
	Xyl	1,2	5,8	6,0
	Glc	6,3	1,2	1,2

*— % от веса сухой обезжиренной водоросли; **— % от экстрактивных веществ.

Таблица 5.6

Характеристика экстрактов (до и после очистки на ультрафильтрационной установке) и конечного продукта из *F. evanescens*

Характеристика	Исходный экстракт	Концентрат	Ультра-фильтрат	Конечный продукт
Экстрактивные вещества, %*	26,4 ± 1,1	14,7 ± 1,2	11,7	12,1 ± 0,9
Фукоидан, %*	10,9 ± 0,3	10,7 ± 0,6	0,2	10,5 ± 0,6
Водорастворимые полисахариды, %*	13,4 ± 1,0	12,6 ± 0,7	0,8	11,3 ± 0,8
Доброкачественность, %**	41,3	72,7	1,7	86,7

*— % от веса сухой обезжиренной водоросли; **— содержание фукоидана (% от экстрактивных веществ).

Таблица 5.7

Характеристика фукоидана и полисахаридной композиции (БАД «Фуколам-С»), полученных из *F. evanescens*

Характеристика	Название продукта	
	Фукоидан	БАД «Фуколам-С»
Выход, %*	10,5 ± 0,6	11–13%
Содержание фукоидана, %**	86,0 ± 1,6	Не менее 60%
Уронаны, %**	2,7 ± 0,8	Не более 35%

Mw _{ср} , кДа	820	840
Сульфаты, %**	21,3 ± 1,5	Не менее 17%
Зола, %**	24,0 ± 0,8	Не более 25%
Влага, %**	12,2 ± 1,1	Не более 15%
Белок, %**	7,0 ± 0,9	н.о.

* — % от веса сухой обезжиренной водоросли; ** — % от экстрактивных веществ.

Выход фукоидана составил 75–78% от содержания в сырье. Оптимизация условий получения фукоидана из *F. evanescens* позволила определить влияние параметров экстракции на качество и количество фукоидана.

Предложенные условия экстрагирования и очистки были использованы для получения из бурой водоросли *F. evanescens* полисахаридной фракции, содержащей фукоидан и водорастворимый альгинат. Эта полисахаридная композиция прошла государственную регистрацию и внесена в Реестр как «Фуколам-С — сырье для пищевой промышленности и производства БАД к пище» (Reg. № RU.77.99.11.003.E.003.153.11.10). На основе этой полисахаридной композиции создана БАД к пище «Фуколам» (Reg. № RU.77.99.11.003.E.054521.12.11). Показана эффективность включения БАД «Фуколам» в комплексную терапию с целью коррекции липидного и углеводного обмена (Майстровский и др., 2008, 2009). БАД «Фуколам-С» была апробирована в качестве основы для иммуноэнтеросорбента, рекомендованного для лечения ожоговых больных и больных с гнойно-септическими заболеваниями (Пат. РФ 2329864).

Получаемая новая информация о способах очистки, режимах экстракции, фармакологическом применении позволяет усовершенствовать способы очистки веществ с выделением однородных по химическому составу групп или индивидуальных соединений с определенной биологической активностью и организовать на этой основе производство новых препаратов.

Технологии выделения фукоидана. Технологии выделения фукоидана при комплексной переработке бурых водорослей

При выборе объекта для промышленного получения фукоидана решающим фактором является доступность сырья. С практической точки зрения как источники фукоиданов привлекательны бурые водоросли порядка Fucales. В дальневосточных морях наиболее перспективным сырьем является бурая водоросль *F. evanescens*, которая имеет обширный ареал распространения, растет на мелководье, легко добывается и содержит фукоидан от 7,7 до 13,6% (Усов и др., 2001; Zvyagintseva et al., 2005). В

Северной Европе как источники фукоидана используют, в основном, два вида фукоидов: *F. vesiculosus* и *Ascophyllum nodosum*, которые содержат этот полисахарид от 13,4 до 16,5% и от 10,0 до 11,5% соответственно (Репина, 2005). В Японии для выделения фукоидана используют водоросли видов *Eisenia bicyclis*, *Cladosiphon okamuranus*, *Sargassum horneri*. В тропических странах источником фукоидана являются водоросли рода Sargassaceae, содержание фукоидана в них невысокое и лишь в отдельных видах может достигать 5,0%.

Первыми внедрили в производство фукоиданы в составе продуктов питания и пищевого сырья в Японии (фирма «Takarabio») в 1996 году, выпустив напиток, а затем другие продукты и косметические товары (Sagawa, Kato, 2003). В качестве сырья для выделения фукоидана использовали водоросль *Kjellmaniella crassifolia*, из которой при 100°C водой экстрагировали фукоидан, затем его очищали ультрафильтрацией и подвергали ферментативному гидролизу (Pat. WO 9747208).

В последние годы в России ряд малых предприятий выпускают лечебно-профилактические средства и биологически активные добавки, содержащие фукоидан. Сотрудниками ТИПРО разработан способ получения фукоидана из ламинарии. По предложенному способу фукоидан экстрагируют из водоросли раствором пищевой кислоты. Далее полученный экстракт фильтруют на мембранах с размером пор от 100 до 300 кДа, фильтрат высушивают с помощью лиофильной, либо распылительной, либо вакуумной сушки (Пат. РФ 2302429). При данном способе выделения и очистки содержание фукоидана в продукте невелико. Продукт представляет смесь фукоидана с сопутствующими полисахаридами и низкомолекулярными примесями. Для дальнейшего использования в профилактической медицине или микробиологии потребуется его дополнительная очистка. Зарубежными компаниями предложены способы получения фукоиданов с низким молекулярным весом. Низкомолекулярный фукоидан, проявляющий антикоагулянтную, антитромботическую активности, рекомендован для применения в качестве терапевтической композиции. Эти способы основываются на контролируемом «лизисе» природного фукоидана, выделенного из водорослей порядка Phaeophyceae. В предложенной авторами технологии (Pat. US 5948405) радикальный гидролиз фукоидана проводили в присутствии солей меди и перекиси водорода. В результате были получены фракции с молекулярной массой 14-29 кДа, оптимальной для проявления антикоагулянтной активности. В другом способе (Pat. US 5321133) контролируемый «лизис» фукоидана осуществляли путем кислотного гидролиза, или радиолиза, или ферментативного гидролиза, или разру-

шения ультразвуком. Полученный лизат разделяли гель проникающей хроматографией на фракции с молекулярными массами от 5 до 40 кДа. Оба способа многостадийны, экономически затратны, выходы фракций с заданными молекулярными массами нестабильны.

Разработаны способы получения фукоидана в технологиях комплексной переработки бурых водорослей (Пат. РФ 2135518, Пат. РФ 2240816). Это позволило снизить себестоимость фукоидана. Комплексные подходы к переработке бурых водорослей наряду с экстракцией включают такие методы, как разделение веществ по химической природе с использованием органических и неорганических реагентов, простые способы химической модификации, хроматографию, биотехнологию, априорно предполагающие более наукоемкие технологии, и сопряженные с ними исследования химических фракций, строения и биологической активности компонентов. Однако, несмотря на это, извлечение ряда биологически активных веществ в едином технологическом цикле сокращает количество отходов производства, приводит к повышению рентабельности производства, снижению себестоимости продукции и является основой рационального использования природных ресурсов.

В России до сих пор традиционными продуктами переработки бурых водорослей являются маннит и альгинат натрия. Различная растворимость маннита и альгината натрия в воде и этиловом спирте позволила разработать способ получения этих веществ в рамках единой технологической схемы. При экстракции бурых водорослей этиловым спиртом с концентрацией 80–90% в раствор переходит маннит, который затем выделяют многократной перекристаллизацией из этанола. Остаток водоросли (шрот) экстрагируют водным раствором щелочи для получения альгината натрия. Такой способ комплексной переработки бурых водорослей используется на Архангельском водорослевом комбинате.

Наличие в составе бурых водорослей других биологически активных веществ, не менее ценных чем маннит и альгинаты, привело к необходимости разработки новых технологий, позволяющих выделять водорастворимые полисахариды (фукоиданы и ламинараны, полиурониды), липиды, пигменты, экстракты, содержащие комплексы этих веществ.

Многочисленные эксперименты по улучшению качества альгината натрия позволили ряду авторов разработать технологическую схему комплексной переработки ламинарии японской (Кизеветтер и др., 1981). Водный экстракт использовали для выделения маннита, хлоридов натрия и калия, йода, ламинарана, а шрот водорослей после очистки формалином и спиртом экстрагировали раствором карбоната кальция для получения альгината натрия. В Японии разработана технология переработки

свежезаготовленных водорослей с использованием отбельных глин. В результате получают альгинат натрия в виде пасты и порошка, маннит, а также йод, хлориды натрия и калия (Пат. Япония 910926). Запатентована технология получения альгиновой кислоты, липофильных веществ и полифенольных соединений. Способ основан на последовательной обработке водорослей раствором кислоты, этиловым спиртом и раствором щелочи (Пат. РФ 2360545). Сотрудниками Пятигорской фармацевтической академии предложен способ получения биологически активных веществ из ламинарии для медицинских целей (Пат. РФ 2194525). Заявленным способом в единой технологической схеме получают маннит, полисахарид-белковый комплекс «Ламинарид СБ», альгинат натрия. В технологии использовалась стадия обезжиривания слоевищ ламинарии хлороформом, но экстрагируемые хлороформом липиды и пигменты, как отдельный продукт, не выделялись и не анализировались. Фармакологическое действие «Ламинарида СБ» рассмотрено узко, только как препарата, обладающего слабительным действием. Сотрудники фирмы «Фитолон» предложили свой способ переработки бурых водорослей (Пат. РФ 2132622). Измельченные водоросли подвергали экстракции органическими растворителями с числом атомов углерода от 1 до 6. Получали после отгонки растворителя липидный концентрат и водный экстракт, которые разделяли. Авторы считают, что данный способ позволяет наиболее полно извлечь жирорастворимую часть бурых водорослей и использовать ее в качестве субстанции для производства лечебно-профилактических добавок «Кламин» и «Фитолон». По мнению авторов, при получении в одном производственном цикле водного и липидного концентратов переработка ламинарии и фукуса становится безотходной, т.к. оставшийся после экстракции шрот водоросли можно использовать в качестве пищевых и кормовых добавок, а также в качестве полупродукта для получения альгинатов. Патентуется способ комплексной переработки бурых водорослей с получением йодсодержащих и полисахаридных продуктов (Пат. РФ 2233104). Способ предусматривает экстракцию измельченных бурых водорослей водным раствором спирта. Из экстракта удаляют спирт. Водно-липидную эмульсию охлаждают и отстаиванием разделяют на водную и липидную фракции. Причем из водной фракции получают йодсодержащий минерально-маннитный комплекс, а из липидной фракции – йодсодержащий липидный комплекс. Водорослевый остаток экстрагируют раствором соляной кислоты и из экстракта спиртовым осаждением получают концентрат фукоидана. Водорослевый остаток экстрагируют при pH 8-9. К полученному щелочному фильтрату добавляют раствор хлористого кальция или карбоната

натрия и получают альгилозу кальция или натрия, соответственно. Предложенный способ переработки водорослей позволяет получить одновременно несколько добавок, содержащих набор биологически активных веществ, максимально извлечь йодсодержащие соединения за счет применения мягких режимов обработки сырья. Однако не все бурые водоросли являются богатым источником йода. Для получения водорастворимых полисахаридов бурых водорослей фукоидана и ламинарана, Звягинцевой с коллегами (Пат. РФ 2135518) разработана технология, которая предусматривает предварительную обработку бурых водорослей органическими растворителями с целью удаления низкомолекулярных веществ. Полученный экстракт предложено использовать в производстве косметических средств. Извлечение водорастворимых полисахаридов проводят раствором соляной кислоты. Фракционирование фукоидана и ламинарана осуществляют с помощью гидрофобной хроматографии. В качестве гидрофобного сорбента используют Полихром-1. В результате применения этого способа упростился процесс разделения водорастворимых полисахаридов и увеличился выход целевых продуктов, получены высокоочищенные препараты ламинарана и фукоидана. Способ комплексной переработки фукусовых водорослей, разработанный Мурманским морским биологическим институтом, предусматривает получение в одном технологическом цикле липидно-пигментного комплекса, маннита очищенного, полисахаридного комплекса и альгината натрия. Для получения липидно-пигментного комплекса в качестве экстрагента используют смесь метилхлорида со спиртом этиловым. Для получения сухого экстракта фукоидана водоросли экстрагируют 5-15% раствором этанола при pH 1-2 при 60°C в течение 6–9 часов с последующим высушиванием. При этом выход фукоидана составляет от 11,6 до 24,1% в зависимости от используемого вида фукуса (Пат. РФ 2337571). Однако, использование слишком разбавленных 15-ти%, а тем более 5-ти% растворов этанола при кислой экстракции фукоидана не приводит к заявленной авторами очистке фукоидана от водорастворимых альгинатов. Способ комплексной переработки бурых водорослей с получением препаратов для медицины и косметологии (Пат. РФ 2240816) был предложен Тихоокеанским институтом биоорганической химии (рис. 5.4). Применяя метод последовательных экстракций и используя экстрагенты различной природы из бурых водорослей предлагается получать различные продукты: водно-этанольный экстракт, содержащий биологически активные низкомолекулярные вещества (табл. 5.8), водорастворимые полисахариды (ламинараны, фукоиданы, маннуронаны), которые можно использовать и как смеси, и после разделения как инди-

видуальные препараты, и альгинат натрия (рис. 5.4). Используя разные температурные режимы экстракции водорастворимых полисахаридов, авторы предлагают провести частичное разделение ламинаранов и фукоиданов, имеющих различное строение. Данный способ обладает универсальным характером. Он может быть применен к разным видам бурых водорослей с учетом варибельности их химического состава. В каждом конкретном случае может быть получен определенный набор кислых и нейтральных полисахаридов и низкомолекулярных веществ (табл. 5.9).

Таблица 5.8

Состав низкомолекулярных веществ водно-этанольных экстрактов бурых водорослей

Состав	<i>F. evanescens</i> *	<i>S. cichorioides</i> **	<i>S. japonica</i> **	<i>C. costata</i> **
Сухие вещества экстракта (% от веса сухой водоросли)	28,0 ± 1,66	39,0 ± 0,97	32,0 ± 1,28	29,0 ± 2,06
Сухие вещества экстракта (г/100 мл)	1,97 ± 0,13	1,32 ± 0,18	2,68 ± 0,9	1,24 ± 0,17
% от сухих веществ экстракта				
Минеральные вещества	35,0 ± 2,55	56,0 ± 1,81	48,0 ± 2,1	60,0 ± 2,31
Маннит	24,0 ± 0,12	27,5 ± 0,31	26,0 ± 0,31	15,1 ± 0,23
Белок	8,1 ± 0,11	3,6 ± 0,83	1,6 ± 0,91	1,7 ± 0,83
Полифенольные соединения	10,1 ± 1,45	1,4 ± 0,23	0,7 ± 0,3	2,0 ± 0,28
Свободные аминокислоты	0,98	1,1	10,6	5,06
Нейтральные сахара	4,0 ± 0,34	3,6 ± 0,36	0,56 ± 0,43	0,7 ± 0,51
Липофильные в-ва	8,9 ± 0,93	4,6 ± 0,45	3,3 ± 0,78	12,0 ± 1,18
Производные хлорофилла	4,8 ± 0,61	0,9 ± 0,21	н.о.	1,7 ± 0,34

* — образец собран в июле; ** — образец собран в мае.

Таблица 5.9

Полисахаридный состав некоторых массовых видов бурых водорослей Японского и Охотского морей

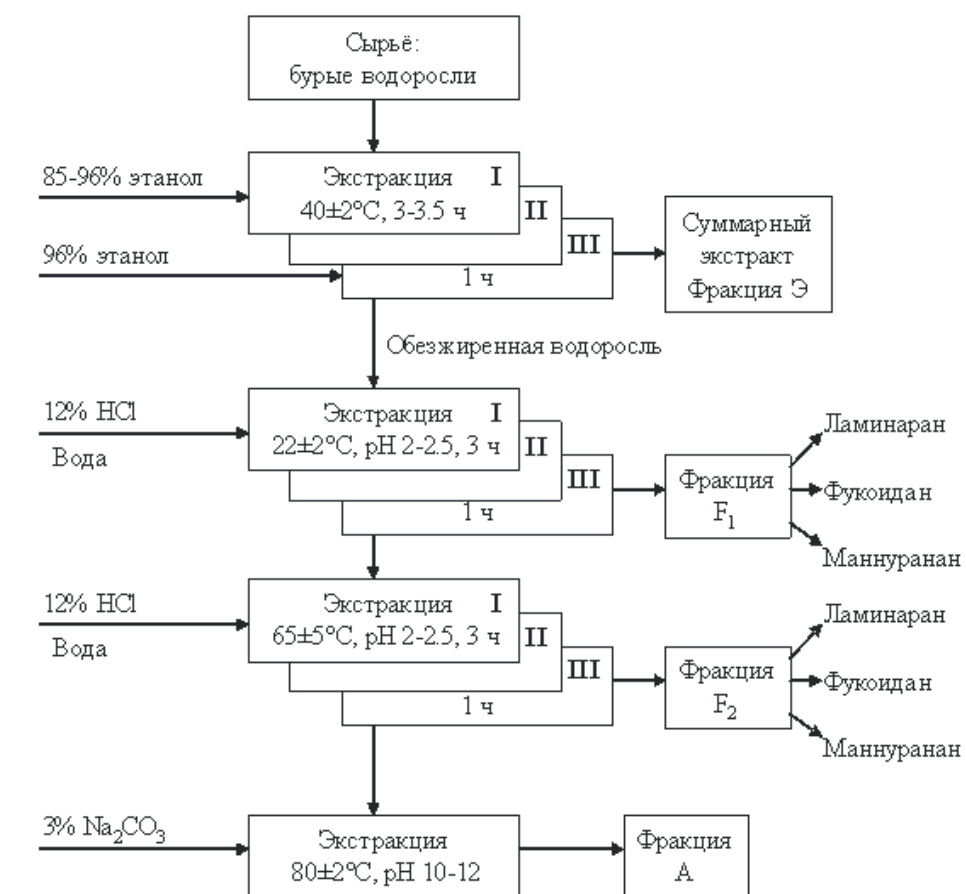


Рис. 5.4. Схема комплексной переработки бурых водорослей

Проблема комплексного использования бурых водорослей не перестает быть актуальной для исследователей. Основными задачами для работы в данном направлении являются увеличение технологических выходов целевых продуктов, улучшение их качественных характеристик, снижение материальных и энергетических затрат в процессе производства. Новые способы переработки водорослей позволят расширить ассортимент биологически активных веществ, применяемых для получения продукции природного происхождения с лечебно-профилактическими свойствами.

Виды водоросли	Водорастворимые полисахариды				Альгинат натрия		Литературный источник	
	Фукоидан		Ламиран		Содержание, %	M/G		
	Содержание, %	Тип фукоидана	Содержание, %	β -1 \rightarrow 3 / β -1 \rightarrow 6				
<i>Saccharina cichorioides</i>	3,0-7,2	1 \rightarrow 3-a-L-фукан Fuc:Gal:Man как 1:0,09:0,08, Fuc:SO ₃ Na- как 1:1,7	5,0-12,6	9,0/1,0	0,3-1,0	20,0-26,3	1,3	Anastyuk et al., 2010; Zvyagintseva et al., 2003; Zvyagintseva et al., 2005; Звягинцева и др., 1998; Усов и др., 1985.
<i>Saccharina japonica</i>	1,5-4,0	Галактофукан Fuc:Gal:Man:Rha как 1:0,3:0,1:0,06	\leq 1,0	9,0/1,0	0,5	22,0-36,5	1,1	Zvyagintseva et al., 2003; Усов и др., 1985; Суховеева, Подкорытова, 2006.
<i>Saccharina gurjanovae</i>	1,5-3,6	Галактофукан Fuc:Gal как 1:1	5,0-22,0	35,0/1,0	0,5-1,1	20,0-28,0	3,0	Шевченко и др., 2007; Звягинцева и др., 1998; Суховеева Подкорытова, 2006.

<i>Alaria fistulosa</i>	0,5-7,8	Галактофукан Fuc:Gal:Man как 1:0,9:0,07	≤0,5	Н.о.	19,0- 21,0	21,4-40,1	3,5; 1,9	Zvyagintseva et al., 2005; Усов и др., 2001; Усов и др., 1985; Усов и др., 2005,
<i>Costaria costata</i>	0,2- 13,8	Галактофукан Fuc:Gal:Man:Rha как 1:0,29:0,08:0,06	≤1,0	5,0/1,0	0,2-2,0	23,0-37,0	1,5- 2,6	Имбс и др., 2009; Усов и др., 1985; Суховеева, Подкорытова, 2006.
<i>Fucus evanescens</i>	5,0- 14,0	1→3;1→4- α-L-фукан Fuc:Gal:Xyl:Man как 1:0,12:0,14:0,11, Fuc:SO ₃ Na- как 1:0,9	1,0-3,0	2,0/1,0	2,0-5,0	14,0-17,3	Н.о.	Zvyagintseva et al., 2003; Zvyagintseva et al., 2005; Звягинцева и др., 1998; Anastyuk et al., 2009.

Глава 6. Антикоагулянтная и фибринолитическая активность сульфатированных полисахаридов

Поиск высокоэффективных заменителей гепарина среди его структурных аналогов — сульфатированных полисахаридов растительного происхождения, не теряет своей актуальности в связи с ресурсной обеспеченностью и безопасностью. Понимание механизмов антикоагулянтного действия этих соединений имеет важное практическое значение, поскольку применение антикоагулянтных препаратов требует индивидуального подхода к больному с учетом их действия на определенные звенья системы гемостаза.

Несмотря на доминирующее положение гепаринов над другими антикоагулянтами прямого действия, гепаринотерапия сопряжена с риском развития ряда осложнений (в том числе возникновение кровотечений, тромбоцитопения, тромбозы, риск иммунных осложнений, остеопения, в результате чего возможны переломы кости (Goodman et al., 2003; Bounameaux, 2004; Gouin-Thibault, 2005; Alvarez, 2007; Castelli, Cassinerio, 2007; Kuitunen et al., 2007), аллергические реакции, головокружение, тошнота, диарея, анорексия, временное выпадение волос (Desay, 2004; Godel, 1996). Кроме того, гепарин в высоких дозах проявляет иммунодепрессивные свойства, выражающиеся в угнетении формирования антителообразующих клеток (Sztein, 1989), депрессии в системе нейтрофильных лейкоцитов (Нестерова и др., 1999). К числу недостатков относится тот факт, что гепарин образуется в метахроматических гранулах тучных клеток млекопитающих и содержится в печени, легких, кишечнике. Кроме того, гепарин является лекарственным препаратом животного происхождения, в связи с этим его использование в клинике сопряжено с риском прионовой контаминации (Зуев, 1999; Ben-Zaken et al., 2003).

Недостатки гепаринотерапии стимулируют разработку новых антикоагулянтных средств, лишенных побочных эффектов этого препарата. Исходя из тех преимуществ, которыми обладают гепарины, а также с учетом его структуры (кислый сульфатированный мукополисахарид, не имеющий разветвленного полисахаридного скелета, состоящий из остатков 1,4-связанного глюкозамина и глюкуроновой кислоты, этерифицированных серной кислотой), поиск новых антикоагулянтов прямого действия активно ведется среди сульфатированных полимеров (полисульфаты пентозана и дерматана, хиторин) и полисахаридов (фукоиданы).

Особый интерес вызывают антикоагулянтная и антитромботическая активности, которые были обнаружены одними из первых в спектре биологических свойств фукоиданов. Впервые антикоагулянтная актив-

ность была выявлена G. Springer et al. (Springer et al., 1957) у фукоидана из бурой водоросли *F. vesiculosus*.

Описание антикоагулянтных свойств занимает преобладающее место в спектре биологической активности фукоиданов. Их изучение проводится, в основном, в связи со структурными особенностями этих соединений. При этом, по мнению многих исследователей, степень антикоагулянтного действия фукоиданов тесно коррелирует с их структурой и функцией (Athukorala et al., 2006; Cumashi et al., 2007; Pomim, 2009; Costa et al., 2011 b).

Степень антикоагулянтной активности у фукоиданов из разных видов бурых водорослей значительно варьирует от слабо выраженной, либо ее отсутствия, до высокой.

Установлена связь между молекулярной массой и антикоагулянтной активностью СПС. Одни исследователи считают, что антикоагулянтная активность фукоиданов связана с высокой молекулярной массой (Zhang, Mao, Fang et al., 2007), другие нижним пределом для проявления этой активности считают 20 кДа (Nishino et al., 1991). Но в целом авторы заключают, что разные фракции фукоиданов имеют свой оптимум молекулярных масс для проявления антикоагулянтной активности (Nishino et al., 1999; Pomim, 2009).

Установлено также, что антикоагулянтная активность фукоиданов коррелирует с содержанием сульфатов. Так, V. Grauffel et al. (Grauffel et al., 1989) исследовали эту корреляцию в отношении фукоиданов из *F. vesiculosus* и *Pelvetia canaliculata* и установили, что, например, антитромбиновая активность фукоиданов возрастала с увеличением содержания сульфатов. Рядом авторов подтверждена эта связь на хорошо изученных фукоиданах с различным содержанием сульфатов и показано, что десульфатированные фракции фукоиданов были малоактивны в коагулологических тестах (Kitamura et al., 1991; Nishino, Nagumo, 1992; Croci et al., 2011). Результаты, полученные этими авторами, свидетельствуют также, что фракции, обогащенные сульфатами, но бедные по содержанию уроновых кислот, проявляют относительно высокую активность, тогда как фракции с обратным соотношением этих структурных составляющих обладают более слабой антикоагулянтной активностью. Исходя из этих данных можно считать, что потенциальные антикоагулянты — фукансульфаты с высокой степенью сульфатирования.

C. Boisson-Vidal et al. (Boisson-Vidal et al., 2000) также отмечают, что антикоагулянтная и антитромботическая активность фракций фукоиданов из *Ascophyllum nodosum* увеличивалась с возрастанием молекулярной массы и содержания сульфатов. При этом фракции нативных фукоиданов, в которых природная структура не была нарушена, оказались более

активными в проявлении антикоагулянтного действия, чем аналогичные по молекулярным массам и степени сульфатирования фракции, но модифицированные частичным десульфатированием.

Помимо этого, антикоагулянтная активность фукоиданов находится в зависимости от моносахаридного состава. Как известно, их структурными моносахаридами являются фукоза, галактоза, манноза, ксилоза в различном соотношении. Однако, эта зависимость очень неоднозначна. Так, показано, что высокое содержание фукозы (а также сульфатов) и низкое содержание других нейтральных сахаров могут способствовать проявлению высокой антикоагулянтной активности фукоиданов (Nishino, Nagumo, 1987; Nishino et al., 1991a,b).

Определенное значение для проявления антикоагулянтных свойств (даже в большей мере, чем степень сульфатирования) имеет соотношение сульфаты/общие сахара (Nishino et al., 1991a). Расчеты показали, что фукоидан, с соотношением менее 3, не является антикоагулянтом. Авторы делают заключение о возможности усиления антикоагулянтной активности фукоидана путем увеличения степени сульфатирования.

В то же время Н.А. Ушакова и др.; N.A. Cumashi et al. (Ушакова и др., 2008; Cumashi et al., 2007) при проведении сравнительного исследования антикоагулянтного действия фукоиданов с разной структурой не выявили прямой зависимости от содержания в них сульфатов, фукозы и других сахаров, а также от структуры основной цепи.

Однако, большинство исследований свидетельствует о том, что для проявления антикоагулянтных свойств важными являются величина молекулярной массы, количество и расположение сульфатных групп, а также моносахаридный состав.

Изучение механизмов антикоагулянтной активности сульфатированных полисахаридов и связи со структурой этих соединений проводится, как правило, в сравнительном аспекте по отношению к гепарину.

Механизм антикоагулянтного действия гепарина заключается в торможении активности тромбина, который катализирует превращение фибриногена в фибрин и некоторые другие реакции в системе гемостаза. Антитромбиновая активность гепарина зависит от наличия плазменного белка антитромбина III (АТ III). АТ III является α -2-глобулином с молекулярной массой 65 кДа, синтезируется в печени и в избыточном количестве имеется в плазме крови. При связывании гепарина с АТ III в молекуле последнего происходят конформационные изменения, которые позволяют ему быстрее соединиться с активным центром тромбина и других сериновых протеаз (факторы IXa, Xa, XIa и XIIa свертывания, калликреин и плазмин). Таким образом, гепарин тормозит тромбооб-

разование, способствуя инактивации тромбина его физиологическим ингибитором АТ III. В присутствии гепарина инактивация тромбина антитромбином III ускоряется примерно в 1000 раз. Несколько меньшее значение для проявления антикоагулянтного действия гепарина имеет «кофактор гепарина II» (НС II), второй гепаринзависимый ингибитор тромбина, отличающийся от АТ III, который нейтрализует тромбин лишь при высоких концентрациях гепарина в плазме крови (Hirsh et al., 2001; Samama et al., 1996).

Механизм антикоагулянтного и антитромботического действия гепаринов зависит от их молекулярной массы. Как НФГ, так и НМГ образуют комплексы с плазменным АТ III. Однако, если комплекс НФГ-антитромбин в равной степени ингибирует тромбин (фактор IIa) и фактор Ха, а также слабее другие ферментные факторы свертывания крови (фактор Хагемана, факторы IX, XI, XII и др.), то у НМГ преобладает анти-Ха активность (Lin et al., 2001; Hoppensteadt et al., 2003). Вариация отношения активностей анти-Ха/анти-IIa составляет от 1,5-2,5 (Certoparin, Parnoparin, Tinzaparin) до 3,6—6,1 (Reviparin) (Boneu, 2000). Чем выше этот показатель, тем более значителен антитромботический эффект и менее выражено антикоагулянтное и геморрагическое действие препарата (Koch et al., 2001).

Механизмы антикоагулянтного действия фукоиданов и гепарина имеют ряд различий. Так, М.Я. Розкин с соавт. (Розкин и др., 1991), исследуя фукоиданы из ряда бурых водорослей, показали, что их антикоагулянтный эффект реализуется путем непосредственного взаимодействия с факторами свертывания крови (и с тромбином) и обусловлен ингибированием активности факторов внутреннего пути свертывания крови — XI, XII и VIII, притом, что активность факторов протромбинового комплекса (внешнего пути свертывания) — II, V и VII и X достоверно не изменяется. В отличие от механизма действия гепарина АТ III в этом процессе участия не принимает. В связи с этим авторы предполагают возможным использование фукоиданов с подобным механизмом действия для эффективной антикоагулянтной терапии у больных с врожденным или приобретенным дефицитом АТ III.

Немаловажная роль в реализации механизмов антикоагулянтной активности фукоиданов принадлежит тромбину. Так, показано, что фукоидан из *F. vesiculosus* активирует НС II *in vitro* и *in vivo*, при этом антитромбиновая активность фукоидана *in vivo* опосредуется НС II, а не АТ III. В данном случае подавление активности тромбина происходит опосредованно (Church et al., 1989) Преимущественная роль НС II по сравнению с АТ III в механизме антикоагулянтной активности

фукоидана из *S. cichorioides* показана также S.J. Yoon et al. (Yoon et al., 2007). Установлено, что фукоидан из *Ecklonia kurome* в значительной степени подавлял тромбообразование как по внутреннему, так и по внешнему путям свертывания, при этом влияние по внутреннему пути было более выражено (Nishino et al., 1999). Кроме того, отмеченный фукоидан также ингибировал образование протромбин-активирующего комплекса (протромбиназы). Таким образом, механизм действия фукоидана из *E. kurome* заключается в ингибирующем эффекте на тромбообразование путем блокирования протромбиназы и предотвращения образования Ха фактора по внутреннему пути свертывания в дополнение к его антитромбиновой активности. Именно этому механизму принадлежит ведущая роль в угнетении фукоиданом тромбообразования по сравнению с его эффектом на антитромбиновую активность через НС II плазмы (Nishino et al., 1999).

По данным F. Trento et al. (Trento et al., 2001) фукоиданы из *F. vesiculosus* и *A. nodosum* проявляли высокую антикоагулянтную активность *in vivo*, которая выражалась в дозозависимом подавлении у кроликов тромбообразования при внутривенном введении фукоиданов. Авторы связывают антикоагулянтный механизм действия фукоиданов с угнетающим воздействием на тромбин и связанные с ним факторы свертывания как на начальном, так и на последующем этапах свертывания. Высокую антитромбиновую активность показали фукоиданы из *Saccharina angustata*, *Pelvetia canaliculata* (Grauffel et al., 1989; Kitamura et al., 1991). При этом низкомолекулярные фракции фукоидана из *P. canaliculata* ингибировали активность тромбина как через НС II, так и посредством активации АТ III, что свидетельствует о значении структурных особенностей в реализации механизма антикоагулянтного действия. А. Cumashi et al., М. Pereira et al. показали, что фукоиданы с разветвленной структурой ингибируют активность тромбина путем прямого воздействия, а с линейной – опосредованно через НС II и АТ III (Pereira et al., 1999; Cumashi et al., 2007).

Таким образом, большая часть фукоиданов ингибирует тромбин в отсутствие АТ III, что отличает их от гепарина, хотя у ряда этих полисахаридов антикоагулянтная активность значительно возрастает в присутствии АТ III.

V. Doctor et al. (Doctor, 1995; Minix, 1997), Т. Nishino et al. (Nishino et al., 2000) отмечают, что фукоидан из *E. kurome* эффективнее гепарина усиливает фибринолиз, потенцируя тканевой и урокиназный активаторы плазминогена *in vitro*. Механизм этого эффекта заключается в связывании фукоидана с плазминогеном и индуцировании структурных изменений чувствительности плазминогена к действию активаторов плазминогена, что предполагает наличие у фукоидана фибринолити-

ческой активности. Это свойство позволяет рассматривать фукоиданы как потенциальное средство для рассасывания тромбов. Дальнейшие исследования показали, что нативный фукоидан из этого вида водоросли увеличивал активность плазминогена *in vitro*, а дополнительно сульфатированный фукоидан – ингибировал или не оказывал влияния на этот процесс (Lang et al., 2004; Hall et al., 2006).

Таким образом, сульфатированные полисахариды из бурых водорослей, сочетающие в себе свойства антикоагулянтов, ингибиторов тромбина, фибринолитиков, перспективны для клинического использования и представляют альтернативу гепарину. Приведенные данные свидетельствуют о том, что фукоиданы обладают разносторонней фармакологической активностью и с успехом могут быть использованы для создания новых БАД к пище и лекарственных препаратов.

Наши исследования касались механизмов антикоагулянтного действия фукоиданов, выделенных из бурых водорослей Охотского моря *F. evanescens* и *S. cichorioides* в тестах *in vitro* и *in vivo* (Кузнецова и др., 2003; Дрозд и др., 2006).

При изучении влияния фукоиданов из *F. evanescens* (I) и *S. cichorioides* (II) на показатели свертывания крови (нормальной плазмы здоровых доноров) в базовых коагуляционных тестах *in vitro* выявлено дозозависимое увеличение времени свертывания по показателям АПТВ- ТВ- и ПВ-тестов.

Пролонгирование показателей АПТВ- и ПВ- тестов свидетельствует об эффективном влиянии фукоиданов I и II на механизмы внутреннего и в меньшей степени – внешнего – путей свертывания. Значительное удлинение ТВ, характеризующего конечный этап свертывания или превращение фибриногена в фибрин под воздействием тромбина, свидетельствует о влиянии фукоиданов на этот процесс и предполагает воздействие на тромбин.

В связи с этим нами исследована ингибиторная активность фукоиданов по отношению к тромбину (фактору IIa) и к фактору Ха. В частности, проведен анализ специфических антикоагулянтных активностей фукоиданов: удельной антитромбиновой (aIIa) активности и удельной активности против фактора Ха (aХа). Способность антикоагулянтных препаратов к торможению активности фактора IIa (тромбина) и активности Ха является их важной характеристикой, особенно в отношении средств, применяемых для профилактики тромбообразования.

При исследовании *in vitro* были установлены следующие показатели ингибиторной активности фукоиданов по отношению к тромбину (фактору IIa): от 22±7 до 29±6 ЕД/мг для фукоидана из *F. evanescens* (I) и от 43±8 до 49±8 ЕД/мг для фукоидана из *S. cichorioides* (II), по отношению к активи-

рованному фактору X (Ха): от 28±7 до 66±10 ЕД/мг для I и от 31±8 до 83±7 ЕД/мг для II. Отношение aХа/aIIa составило 1,3–2,3 для I и 0,7–1,7 для II, что является показателем терапевтического эффекта и свидетельствует о перспективности практического применения исследуемых фукоиданов в качестве антикоагулянтных и антитромботических средств.

Дальнейшее исследование механизмов антикоагулянтного действия фукоиданов, а именно изучение возможности прямого антитромбинового действия фукоидана из *F. evanescens* или способности тормозить самосборку фибрин – мономера проводили путем оценки его влияния на свертывание очищенного препарата фибриногена тромбином. При анализе полученных нами результатов установлено отсутствие антикоагулянтного эффекта под влиянием фукоидана в диапазоне концентраций от 1 до 1000 мкг/мл, что характерно и для внесения в такую тест-систему гепарина. Это позволило нам предположить, что прямым антитромбиновым действием фукоидан не обладает, а его антикоагулянтное действие обусловлено активацией АТ III, т.е., как и гепарин, фукоидан не является прямым ингибитором тромбина, а действует опосредованно, через какой-либо компонент плазмы.

Для проверки данного предположения было предпринято исследование антикоагулянтного действия фукоидана в присутствии АТ III и без него с использованием тест-системы с хромогенным субстратом, специфичным по отношению к тромбину.

Результаты данного исследования показывают, что оптическая плотность в смеси фукоидана в концентрации 100 или 1000 мкг/мл, тромбина и хромогенного субстрата, не содержащей АТ III, близка к оптической плотности в контроле, где вместо фукоидана вносили буферный раствор. Близкие к контролю значения оптической плотности были обнаружены в смеси тромбина, хромогенного субстрата и гепарина. Т.е., показатели поглощения в пробах под влиянием фукоидана и гепарина являются сопоставимыми. Это свидетельствует об отсутствии самостоятельного (без АТ III) антикоагулянтного действия фукоидана. Снижение оптической плотности (в сравнении с контролем) смеси фукоидана в концентрациях 100 или 1000 мкг/мл, тромбина, хромогенного субстрата и АТ III было сопоставимым с таким же снижением в смеси гепарина, тромбина, хромогенного субстрата и АТ III, различия между этими показателями не являются статистически значимыми ($p > 0,05$). Очевидно, что это снижение обусловлено инактивацией тромбина антикоагулянтом (фукоиданом либо гепарином) в присутствии АТ III.

При исследовании антикоагулянтной активности фукоиданов *in vivo* установлено, что однократное внутривенное введение фукоидана I

в дозе 5 мг/кг мышам линии BALB/c приводило к гипокоагуляции, о чем свидетельствует увеличение времени свертывания в АПТВ-тесте в 3,3 раза ($p>0,05$) и в тромбо-тесте — в 4,0 раза ($p>0,05$) через 15 мин после инъекции (табл. 1). По истечении 30 мин время свертывания в этих тестах отличалось от контрольного в 1,8 и 1,6 раза, а через 60 мин показатели коагулограммы возвращались к контрольному уровню. При введении мышам фукоидана II в такой же дозе время свертывания плазмы через 15 мин после введения увеличивалось по сравнению с контролем в 4,1 раза в АПТВ-тесте ($p<0,05$) и в 5,3 раза в тромбо-тесте ($p<0,05$); через 30 мин после инъекции препарата время свертывания возрастало в 2,9 и 2,1 раза ($p<0,05$) соответственно. К контрольному уровню время свертывания возвращалось только через 180 мин, т.е. антикоагулянтный эффект фукоидана II был более продолжителен по сравнению с фукоиданом I (табл. 6.1).

При увеличении кратности введения фукоидана из *F. evanescens* животным до 10 (ежедневное внутрибрюшинное введение в течение 10 суток) отмечен более выраженный процесс гипокоагуляции с замедлением по сравнению с контролем времени свертывания в АПТВ-тесте в 3,6 раза, в ПВ-тесте в 3,3 раза, в ТВ-тесте в 7,1 раза ($p\leq 0,05$) (табл. 2).

В связи с тем, что фукоиданы перспективны для разработки новых БАД к пище и лекарственных препаратов, важным является исследование антикоагулянтной активности фукоиданов при условии их введения per os. В этом случае доза фукоидана составила 50 мг/кг.

При 10-кратном пероральном введении фукоидана показатели гемостаза не отличались статистически значимо от таковых в контроле. При увеличении продолжительности перорального введения фукоидана животным до 30 дней наблюдалось пролонгирование времени свертывания в 1,4-1,5 раза по сравнению с контролем ($p\leq 0,05$) (табл. 2).

Таким образом, фукоидан из *F. evanescens* оказывает антикоагулянтный эффект при парентеральном и длительном (30-кратном) пероральном введении животным. С увеличением кратности введения фукоидана развивается более глубокая гипокоагуляция.

Таблица 6.1

Показатели гемостаза при внутрибрюшинном введении фукоиданов, выделенных из *F. evanescens* (I) и *S. cichorioides* (II), мышам BALB/c

Время после введения (мин)	Время свертывания плазмы крови (сек)							
	АПТВ				ТВ			
	I	ИС	II	ИС	I	ИС	II	ИС
15	150±20*	3,3	180±8*	4,0	70±10,7*	4,1	90±14*	5,3
р к К	<0,05		<0,05		<0,05		<0,05	
р I-II	>0,05				>0,05			
30	90±11	1,8	130±11*	2,9	28±3,4	1,6	35±2,7*	2,1
р к К	>0,05		<0,05		>0,05		<0,05	
р I-II	>0,05				>0,05			
60	47±0,9	1,0	75±9,7	1,6	17±0,8	1,0	20±1,6	1,2
р к К	>0,05		>0,05		>0,05		>0,05	
р I-II	>0,05				>0,05			
180	45±1,6	0,99	44±1,4	0,96	17,0±0,9	1,0	17±0,8	1,0
р к К	>0,05				>0,05			
р I-II	>0,05				>0,05			
Контроль (К)	45,5±1,1				17,0±0,5			

Примечание: показатели гемостаза $Me\pm m$; ИС — индекс стимуляции — рассчитан как отношение времени свертывания в опыте и контроле; р-значимость различий показателей в опыте по сравнению с контролем (К); использован непараметрический Q-критерий Данна; при сравнении показателей I и II использован непараметрический z-критерий Манна-Уитни; n=5; (* $p<0,05$) — различия статистически значимы по отношению к контролю.

Таблица 6.2

Влияние фукоидана из *F. evanescens* на систему гемостаза у мышей BALB/c в зависимости от кратности и способа введения

Показатель гемостаза ($Me\pm m$)	Группа животных									
	Контроль	Фукоидан 1-кратно в/б	ИС	Фукоидан 10-кратно в/б	ИС	Фукоидан 10-кратно п/о	ИС	Фукоидан 30-кратно п/о	ИС	
АПТВ (сек.)	45,0±1,2	82,0±3,6*	1,8	163,0±4,8*	3,6	52,0±2,6	1,2	62,0±2,6*	1,4	
р		<0,05		<0,05		>0,05		<0,05		
ПВ (сек.)	17,0±0,8	21,0±1,1*	1,2	56,0±2,0*	3,3	20,0±1,4	1,2	25,0±1,1*	1,5	
р		<0,05		<0,05		>0,05		<0,05		

ТВ (сек.)	19,0±0,7	32,0±1,6*	1,7	135±4,0*	7,1	23,0±1,3	1,2	26,0±1,0*	1,4
p		<0,05		<0,05		>0,05		<0,05	

Примечание: показатели гемостаза $M \pm m$; ИС — индекс стимуляции — рассчитан как отношение времени свертывания в опыте и контроле; p-значимость различий показателей в опыте по сравнению с контролем; использован непараметрический Q-критерий Данна; n=5; (*p<0,05) — различия статистически значимы.

Для исследования специфической антикоагулянтной активности плазмы в экспериментах *in vivo* фукоиданы I и II вводили однократно внутривенно в дозах 5 и 10 мг/кг крысам Wistar.

При введении фукоидана I отмечено незначительное увеличение показателей антикоагулянтной активности плазмы с увеличением дозы. Так, активность фактора Ха регистрировалась только через 5 мин после введения и составила 0,2±0,02 ЕД/мл и 0,3±0,02 ЕД/мл в зависимости от вводимой дозы. Показатели аIIa активности через 5 мин после введения фукоидана I составляли достаточную для терапевтического эффекта величину (2,3±0,23 ЕД/мл и 2,5±0,36 ЕД/мл) (табл. 6.3). В отношении фукоидана II в дозе 10 мг/кг аХа доходила до 0,95±0,06 ЕД/мл, а аIIa до 3,1±0,24 ЕД/мл. Эффект по аХа активности для фукоидана II сохранялся до 60 мин (0,43±0,09 ЕД/мл; p=0,002). Длительность эффекта по аIIa активности составила 180 мин (срок наблюдения) для обоих препаратов. В зависимости от срока после введения крысам каждого из исследуемых препаратов отмечалось снижение эффекта 3—12 — кратно (табл. 6.3).

Таким образом, внутривенное введение крысам фукоиданов I и II вызывает дозозависимое усиление специфической антикоагулянтной активности плазмы. Следует отметить, что, несмотря на больший показатель соотношения аХа/аIIa для фукоидана I из *F. evanescens*, сила и длительность антикоагулянтного эффекта для фукоидана II из *S. cichorioides* выше. Это, по-видимому, объясняется различием в удельной антитромбиновой активности образцов (у II фукоидана аIIa активность в два раза больше, чем у I) при практически одинаковых ингибиторных активностях фукоиданов по отношению к фактору Ха.

Наши исследования включали также изучение способности фукоиданов к комплексообразованию с протамином сульфатом. Необходимость нейтрализации антикоагулянтного эффекта у пациентов возникает во время угрозы кровотечения, возникающей при длительном приеме антикоагулянтов, а также при угрозе кровотечений, появляющейся при различных хирургических вмешательствах с использованием антикоагулянтов, при экстракорпоральном кровообращении при операциях на

открытом сердце или программном гемодиализе при заместительной терапии с использованием антикоагулянтов (Haverkamp et al., 2003; Schick et al., 2004;). Известна способность протамина сульфата нейтрализовать антикоагулянтную активность нефракционированного и некоторых низкомолекулярных гепаринов. Нейтрализация антикоагулянтного эффекта гепарина происходит за счет электростатического взаимодействия между отрицательно заряженным полисахаридом и положительно заряженным протамином сульфатом с возникновением комплекса (Ramamurthy et al., 1999).

Таблица 6.3

Антикоагулянтная активность плазмы крыс после внутривенного введения фукоиданов, выделенных из *F. evanescens* (I) и *S. cichorioides* (II)

Фукоидан	Доза (мг/кг)	Активность (ЕД/мл)	Время после введения (мин)					
			5	15	30	60	120	180
I	5	aХа	0,2±0,02*	0	0	0	0	0
		p	0,035					
	aIIa	2,3±0,23*	1,1±0,15*	1,3±0,34*	0,7±0,22*	0,6±0,2*	0,5±0,09*	
	p	0,000	0,000	0,002	0,012	0,021	0,000	
	10	aХа	0,3±0,02*	0	0	0	0	0
		p	0,000					
aIIa	2,5±0,36*	2,0±0,27*	1,7±0,15*	1,2±0,14*	0,7±0,09*	0,2±0,01*		
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022		
II	5	aХа	0,81±0,06*	0,31±0,05*	0,12±0,03	0	0	0
		p	0,000	0,003	1,000			
	aIIa	2,8±0,25*	2,4±0,21*	2,1±0,22*	1,4±0,1*	1,1±0,09*	0,6±0,05*	
	p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	10	aХа	0,95±0,06*	0,77±0,05*	0,61±0,13*	0,43±0,09*	0,29±0,1	0,11±0,06
		p	0,000	0,000	0,000	0,002	0,115	0,883
aIIa	3,1±0,24*	2,7±0,21*	2,4±0,2*	1,6±0,11*	1,3±0,13*	0,9±0,08*		
p	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
Контроль		aХа	0,12±0,03					
		aIIa	0,10±0,04					

Примечание: показатели $M \pm m$; p — значимость различий показателей в опыте по сравнению с контролем; использован параметрический t-критерий Стьюдента; n=15; (*p<0,05) — различия статистически значимы по отношению к контролю.

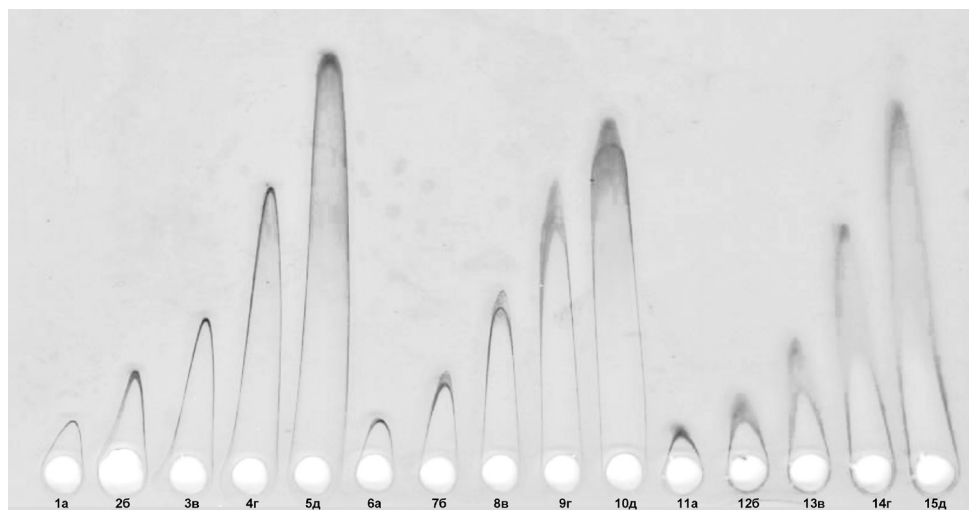


Рис. 6.1. Комплексообразование с сульфатом протамина фукоиданов из *F. evanescens* (I) (6–10) и *S. chorioides* (II) (11–15) в сравнении с гепарином (1–5) в геле агарозы. Концентрация фукоиданов и гепарина (мг/мл): а — 0,31; б — 0,63; в — 1,25; г — 2,5; д — 5,0

На рис. 1 представлено сканированное изображение результата электрофореза образцов фукоиданов в агарозном геле, в который добавлен протамина сульфат. Зоны преципитации окрашенных комплексов полисахарид-белок имеют вид ракеток. Фукоиданы I и II, внесенные в гель в концентрации от 31 до 500 мкг/мл образуют комплексы с протамина сульфатом. Установлено, что чем больше концентрация, тем больше высота и площадь пика преципитации (рис. 6.1). Коэффициенты корреляции между высотой и площадью пиков преципитации в отношении как I, так и II образцов фукоиданов значительны и составляют $r=0,97\pm 0,05$ ($p=0,002$) и $r=0,98\pm 0,07$ ($p=0,001$), соответственно.

Таким образом, фукоиданы способны создавать комплексы с известным для гепаринов антидотом — протамина сульфатом.

Важной характеристикой препаратов, применяемых в качестве тромболитических средств является усиление фибринолиза. В связи с этим нами исследовано влияние фукоидана на систему фибринолиза в тесте спонтанного эуглобулинового лизиса, скорость которого отражает количество плазминогена и степень его активации в плазме, а также путем количественного определения плазминогена на основе гидролиза хромогенного субстрата, свидетельствующего о потенциальной активности плазминовой системы.

Как известно, время лизиса эуглобулинов отражает активный потенциал плазминовой системы. Укорочение времени лизиса сгустка свидетельствует

об активации фибринолиза, а активация фибринолиза соответствует увеличению активности и количества плазминогена — неактивного предшественника плазмина — фермента, расщепляющего фибрин и ФГ (Баркаган, Момот, 2001; Макаров, Горбунова, 2003).

В экспериментах *in vitro* было установлено, что фукоидан во всем диапазоне исследуемых концентраций (10-1000 мкг/мл) способствовал возрастанию уровня основного компонента фибринолитической системы — плазминогена. Максимальное количество плазминогена (вдвое превышающее контрольные показатели, $p<0,05$) зарегистрировано при действии фукоидана в концентрации 1000 мкг/мл (табл. 6.4).

Таблица 6.4

Влияние фукоидана из *F. evanescens* на уровень плазминогена в плазме доноров (*in vitro*)

Концентрация фукоидана (мкг/мл)	Концентрация плазминогена (%)	ИС
1000	198,2±12,6* $p<0,05$	2,2
500	175,0±5,8* $p<0,05$	1,9
100	160,0±4,2* $p<0,05$	1,7
50	131,0±5,4* $p<0,05$	1,4
10	128,0±4,6* $p<0,05$	1,4
Контроль	92,0±3,5	

Примечание: показатели $Me\pm m$; ИС — индекс стимуляции — рассчитан как показатель в опыте и контроле; p — значимость различий показателей в опыте по сравнению с контролем по результатам дисперсионного анализа ($*p<0,05$); $n=6$; использован непараметрический Q-критерий Данна.

Исследование показателей фибринолиза через 30 мин после однократного введения фукоидана мышам показало незначительное усиление скорости спонтанного эуглобулинового лизиса и увеличение уровня плазминогена в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой ($p\leq 0,05$). При 10-кратном введении фукоидана наблюдалась более интенсивная активации фибринолиза ($p\leq 0,05$) и увеличение уровня плазминогена в 2,7 раза по сравнению с контролем ($p\leq 0,05$) (табл. 6.5).

При исследовании уровня фибриногена (ФГ) в сыворотке крови у животных этой группы статистически значимых изменений не выявлено ($p > 0,05$) (табл. 6.5).

Таблица 6.5

Влияние фукоидана из *F. evanescens* на показатели фибринолитической системы и уровень фибриногена у мышей BALB/c в зависимости от кратности введения

Показатель гемостаза (Me±m)	Группа животных				
	Контрольная	Фукоидан 1-кр. в/6	ИС	Фукоидан 10-кр. в/6	ИС
ФА (мин)	270±18	240±11 p>0,05	0,9	210±10* p<0,05	0,8
ФГ (г/л)	4,1±0,2	3,5±0,2 p>0,05	0,85	3,5±0,1 p>0,05	0,85
Уровень плазминогена (%)	75,0± 3,9	172,8±7,1* p<0,05	2,3	200,0±13,3* p<0,05	2,7

Примечание: показатели гемостаза Me±m; ИС — индекс стимуляции- рассчитан как отношение показателя в опыте к контролю; p-значимость различий показателей в опыте по сравнению с контролем; n=5; использован непараметрический Q-критерий Данна; p — значимость различий по результатам дисперсионного анализа (* $p \leq 0,05$).

Представленные результаты свидетельствуют о том, что фукоиданы, выделенные из бурых водорослей *F. evanescens* и *S. cichorioides*, обладают свойствами антикоагулянтов прямого типа действия.

Исследование механизмов антикоагулянтной активности позволило установить эффективное влияние этих фукоиданов на факторы внутреннего и внешнего путей свертывания, а также на конечный этап свертывания или превращение фибриногена в фибрин под воздействием тромбина.

Антикоагулянтная активность фукоидана из *F. evanescens* связана с плазменным АТ III. Фукоидан, как и гепарин, превращает АТ III из медленно действующего в быстродействующий ингибитор тромбина.

Исследованные фукоиданы демонстрируют ингибиторную активность в отношении тромбина (фактора IIa) и фактора Ха. При этом отмечено, что, несмотря на большой показатель соотношения $a\text{Ха}/a\text{IIa}$ для фукоидана из *F. evanescens*, сила и длительность антикоагулянтного эффекта для фукоидана из *S. cichorioides* выше. Это объясняется различием в удельной антитромбиновой активности образцов (у последнего $a\text{IIa}$

активность вдвое больше, чем у первого) при практически одинаковых ингибиторных активностях по отношению к фактору Ха.

Полученные в экспериментах *in vitro* и *in vivo* результаты свидетельствуют, что фукоидан из *F. evanescens* относится к препаратам, влияющим на систему коагуляционного гемостаза и фибринолиза как прямо, так и опосредованно. Влияние на систему фибринолиза осуществляется путем активации эндогенной фибринолитической системы крови и связано с повышением потенциальной активности плазминовой системы.

Таким образом, исследуемые фукоиданы обладают свойствами антикоагулянтов и активаторов фибринолиза, в связи с чем имеют большие перспективы клинического применения в этом качестве.

Результаты проведенных экспериментальных исследований позволили нам разработать гипотетическую схему механизмов действия фукоидана на систему гемостаза (рис. 6.2).

Как показано на рис. 6.2, фукоидан оказывает прямое влияние на факторы внутреннего и внешнего путей свертывания, а также на конечный этап свертывания и демонстрирует ингибиторную активность в отношении тромбина (фактора IIa) и фактора Ха. Антикоагулянтная активность фукоидана связана с плазменным антитромбином III, который превращается из медленно действующего в быстродействующий ингибитор тромбина. Влияние фукоидана на систему фибринолиза осуществляется путем активации эндогенной фибринолитической системы крови и связано с повышением потенциальной активности плазминовой системы.



Рис. 6.2. Гипотетическая схема механизма действия фукоидана на систему гемостаза

Глава 7. **Коррекция атерогенных дислипидемий полисахаридами морских водорослей**

Смертность и инвалидизация от заболеваний органов кровообращения занимает лидирующее положение в структуре заболеваемости и смертности не только в России, но и за рубежом. Общеизвестной причиной сердечно-сосудистых заболеваний и их осложнений является атеросклероз. Отягчающим фактором ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы, в частности, атеросклероза, служит окислительный стресс, развивающийся на фоне снижения уровня природных низко- и высокомолекулярных антиоксидантов в тканях. Дислипидемии и индуцированный ими оксидативный стресс являются ключевым патогенетическим звеном атеросклероза.

Сравнительно недавно основное значение в развитии атеросклероза придавали гиперхолестеринемии, но затем клинические и эпидемиологические исследования показали, что любая гиперлипидемия может способствовать возникновению и дальнейшему развитию этой болезни. В этой связи эффективность профилактических и лечебных мероприятий на всех стадиях атеросклероза во многом связана с коррекцией дислипидемий, нормализацией углеводного обмена и антиоксидантного статуса.

В настоящее время существуют разные по механизму действия медикаментозные и немедикаментозные средства, воздействующие на липиды и липидтранспортную систему крови: препараты группы статинов – ингибиторов ГМГ-КоА-редуктазы (аторвастатин, ловастатин, правастатин), ингибиторы абсорбции холестерина (эзетимиб), анионообменные смолы (холестирамин, колестипол), производные фиброевой кислоты – фибраты (клофибрат, гемфиброзил, безафибрат), препараты никотиновой кислоты (ниацин, эндурацин), соединения омега-3. Постоянный или длительный прием этих препаратов замедляет процесс прогрессирования атеросклероза. Однако высокая стоимость лечения и побочные эффекты диктуют поиск альтернативных решений. Одно из таких решений – использование сульфатированных полисахаридов из природных, в том числе морских источников. Начало положили исследования липидснижающего действия гепарина, который является сульфатированным полисахаридом и оказывает гиполлипидемическое действие в эксперименте. Основным механизмом действия гепарина является активация фермента липопротеидлипазы, который гидролизует богатые триглицеридами липопротеиды. Уменьшение уровня последних приводит к снижению вязкости крови, улучшению микроциркуляции, к

усилению транспорта кислорода в ткани, уменьшению агрегации тромбоцитов, а самое главное – способствует увеличению концентрации антиатерогенных липопротеинов высокой плотности. В то же время, выраженное антикоагулянтное действие и быстрая инактивация гепарина, а также необходимость постоянного контроля за возможностью возникновения осложнений типа остеопороза и тромбоцитопении осложняют его применение при гиперлипидемиях. В связи с этим увеличился интерес к изысканию и изучению аналогов гепарина, лишенных побочных эффектов. В работе (Рыженков и др., 1996) исследовано гиполлипидемическое действие СПС – сульфатов хитозана (получены химическим путем) и сульфопроизводных крилана и лютелана. Было установлено выраженное гипотриглицеридемическое действие, а также увеличение уровня ЛПВП в сыворотке крови. Эти эффекты могут быть связаны со свойством препаратов активизировать липопротеидлипазу. Известно, что существует обратная корреляция между содержанием α -холестерина и триглицеридов в сыворотке крови (Nikkila, 1978), что обусловлено активностью этого фермента. Влияние холестерина на липолитическую активность крови кроликов свидетельствует о том, что эти производные хитозана являются эффективными активаторами липолитических ферментов. Тенденцию к гипохолестеринемическому действию сульфатов полисахаридов можно объяснить снижением всасывания холестерина в кишечнике. Следует отметить, что в опытах *in vitro* наиболее активными были соединения с большей молекулярной массой, в эксперименте на животных большую активность проявили соединения с меньшей молекулярной массой – 20–40×10 кДа. Это объясняется, по-видимому, тем обстоятельством, что вещества с большей молекулярной массой хуже всасываются в кишечнике. Если учесть также тот факт, что токсичность изученных соединений увеличивается с увеличением молекулярной массы, а активность зависит от степени сульфатирования, что подтверждается и другими авторами, то можно считать целесообразным проведение дальнейших исследований при использовании веществ с молекулярной массой 20–40 кДа и содержанием серы 9–14%. Наличие дополнительного антиоксидантного действия у некоторых из изученных сульфатированных соединений также указывает на перспективность применения этих веществ в качестве возможных гиполлипидемических средств.

Доказана эффективность включения в профилактические и лечебные комплексы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы препаратов-антиоксидантов. Действие синтетических препаратов направлено на конкретное патогенетическое звено. В отличие от синтетических при-

родные препараты сочетают в себе суммарные биологические эффекты, опосредованные разнообразным составом их компонентов. В связи с этим для фармакотерапии, направленной на профилактику рецидивов заболеваний сердца и их прогрессирование стали все чаще применять природные биологически активные вещества, экстракты водорослей и БАД к пище на их основе, обладающие наряду с липидкорректирующими эффектами и антиоксидантными свойствами, в частности, сульфатированные полисахариды из морских водорослей.

Экспериментальные исследования на животных и клинические наблюдения на людях доказывают, что полисахариды из морских водорослей снижают такой важный фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний как уровень холестерина в сыворотке крови. Сульфатированные полисахариды обладают комплексом благоприятных эффектов на организм человека (Запорожец, 2006), обусловленных их способностью связывать и выводить из организма экзо- и эндогенные токсические вещества и уменьшать проявления интоксикации различного генеза (Кузнецова, 2009). Сульфатированные полисахариды являются пищевыми волокнами, поэтому их можно применять практически без ограничений, не вызывая заметных нежелательных реакций.

Важным свойством пищевых волокон является их устойчивость к действию амилазы и других ферментов и поэтому в тонком кишечнике они не всасываются. Это свойство обеспечивает их своеобразное физико-химическое действие. При прохождении по кишечнику пищевые волокна формируют матрикс аморфного характера по типу “молекулярного сита”, физико-химические свойства которого обуславливают водоудерживающую способность, катионообменные и адсорбционные свойства, чувствительность к бактериальной ферментации в толстой кишке. Наличие у пищевых волокон гидроксильных и карбоксильных групп способствует кроме гидратации, ионообменному набуханию. Это свойство пищевых волокон способствует ускоренному кишечному транзиту, увеличению влажности и массы фекалий и снижению напряжения кишечной стенки. В желудке под влиянием пищевых волокон замедляется эвакуация пищи, что создает более длительное чувство насыщения, ограничивает потребление высокоэнергетизированной пищи и способствует снижению избыточной массы тела (Бабаян, 2011).

Механизм холестерин-снижающего действия полисахаридов обусловлен связыванием в просвете кишечника желчных кислот, обеспечивающих всасывание холестерина в кровь. В результате повышения вязкости содержимого кишечника усиливается фекальная экскреция желчных кислот. Вследствие усиленного синтеза в печени новых желч-

ных кислот происходит снижение уровня холестерина в крови. Кроме того, так как полисахариды слабее связывают гидрофильные желчные кислоты, в плазме увеличивается относительное содержание гидрофобных желчных кислот, которые сильнее, чем гидрофильные, ингибируют активность холестерин-7 α -гидроксилазы в печени. Другое объяснение может состоять в продукции короткоцепочечных жирных кислот (пропионовой, уксусной и масляной) при бактериальной ферментации полисахаридов. Экспериментально показано, что эти кислоты ингибируют синтез холестерина в печени. Кроме этого, хитозан, например, способен образовывать ионные комплексы с жирами, в том числе, с холестерином и ингибировать их абсорбцию и рециркуляцию из кишечника в печень (Ylitaо et al., 2002).

Гиполипидемический эффект сульфатированных полисахаридов, сухих порошков из красных, бурых и зеленых водорослей, их смесей, а также экстрактов из них отмечен многими авторами (Soeda et al., 1994; Ren et al., 1994; Ara et al., 2002; Raghavendran et al., 2005; Amano et al., 2005; Yokota et al., 2009; Godard et al., 2009).

В экспериментах на животных показана способность фукоидана из водоросли *S. japonica* значительно снижать уровень ОХ, ТГ и ЛПНП и увеличивать содержание в сыворотке крови ЛПВП при гиперхолестеринемии и гиперлипидемии, нормализовать процессы перекисного окисления липидов, а также эффективно предотвращать формирование экспериментальной гиперхолестеринемии (Li et al., 1999, 2001, 2008). Результаты клинических испытаний фукоидана у больных с гиперлипидемией (Li et al., 2008) также свидетельствуют о гиполипидемических свойствах данного полисахарида.

I.Dvir et al. (2009) провели сравнительное исследование эффективности биомассы красной микроводоросли *Porphyridium sp.* и выделенного из нее полисахарида у крыс с гиперлипидемией. Употребление животными в пищу биомассы водоросли (БВ) и полисахарида на 22–34% снижали ОХ, на 12–39% — ТГ и на 32–53% — ЛПНП в сыворотке крови. Коэффициент атерогенности был выше в группе животных, получавших БВ, по сравнению с контролем. Обращает на себя внимание тот факт, что у крыс, получавших полисахарид, сухой вес фекалий был больше на 3,17 г/день, при использовании БВ — на 2,46 г/день (в контроле — 1,07 г/день). В кале крыс, получавших БВ и полисахарид, имело место повышение уровня нейтральных стиролов. Что касается желчных кислот, то они были более, чем вдвое повышены у животных, получавших БВ. У крыс опытных групп (получали биомассу водоросли и полисахарид) был значительно ниже вес печени (37,76 и 35,39 мг на грамм массы тела), чем в

группе контроля (42,86 мг на грамм массы тела). Кроме того, в опытных группах отмечен низкий уровень холестерина в печени (в опыте — 1,89 и 2,14 мг на г массы печени, в контроле — 3,89 мг/г массы печени). Все эти показатели свидетельствуют о терапевтическом эффекте БВ и ПС, полученного из нее, и перспективности применения этих биопрепаратов при различных хронических заболеваниях печени, таких, как жировая дистрофия и пр. Близкие результаты получены и другими авторами (Ara et al., 2002; Pengzhan et al., 2003; Werman et al., 2003; Amano et al., 2005). У животных, получавших биопрепараты и имевших высокий показатель ОХ, было обнаружено повышение НМГ-СоА редуктазы — ключевого фермента в продукции эндогенного холестерина. Такие результаты были получены при содержании в рационе 5–10% БВ или полисахарида.

Механизм действия БВ и полисахаридов могут быть различными благодаря их уникальным, но различным физико-химическим свойствам (вязкости, растворимости, электрическому заряду и пр.) (Geresh, Arad, 1991; Eteshola et al., 1998; Arad, Richmond, 2004; Arad et al., 2006). Биомасса водоросли содержит, в основном, нерастворимые волокна, в то время, как большая часть волокон в полисахаридах — растворимые.

Фукоидан из водоросли *F. vesiculosus* повышал секрецию липопротеинлипазы в культуре адипоцитов. При этом его уровень зависел от времени воздействия и дозы полисахарида (Yokota et al., 2009). Этот фермент, относящийся к классу липаз, расщепляет триглицериды самых крупных по размеру и богатых липидами липопротеинов плазмы крови — хиломикрон и ЛПОНП. Липопротеинлипаза регулирует уровень липидов в крови, что определяет ее важное значение при атеросклерозе. Фермент синтезируется в адипоцитах, клетках сердечной и скелетной мышц и некоторых других тканях и имеет центр связывания липопротеинов и каталитический центр для гидролиза жиров. Гидролиз активируется аполипопротеином С-II, который содержится в хиломикронах ЛОНП. Таким образом, гидролиз жиров происходит в комплексе, включающем липопротеин, липопротеинлипазу и внутреннюю поверхность капилляра. Жирные кислоты, образующиеся в результате гидролиза жиров, с помощью этого комплекса поступают в клетки, питаемые данным капилляром (в адипоциты — в жировой ткани, в миоциты — в мышечной ткани и т.д.).

Хиломикроны, циркулирующие в крови, в результате контактов с ЛПЛ постепенно освобождаются от триацилглицеринов и превращаются в остаточные хиломикроны, которые содержат очень мало триацилглицеринов и много холестерина. Остаточные хиломикроны (а частично и цельные) поглощаются клетками печени. Такой же путь превращений

проходит примерно половина ЛОНП. Другая половина ЛОНП в крови превращается в ЛПНП, которые поглощаются как гепатоцитами, так и многими другими клетками.

Установлено, что фукоидан индуцирует секрецию кофактора липопротеинлипазы, аполипопротеина С-II (АроС-II). В клетках, обработанных фукоиданом, экспрессия гена этого фермента повышалась в зависимости от времени воздействия, количество его также увеличивалось. Обработка адипоцитов одновременно гепарином и фукоиданом не повышала показателей ЛПЛ по сравнению с одним гепарином. Таким образом, фукоидан действует в этом случае подобно гепарину, освобождая липопротеинлипазу, повышая внутриклеточный транспорт и снижая деградацию фермента в среде. Секреция липопротеинлипазы и АроС-II, индуцированная фукоиданом, может обуславливать регуляцию ТГ в плазме крови (Yokota et al., 2009).

Фукоидан повышал активность не только ЛПЛ, но также печеночного липопротеина и лецитин-холестерол-ацилтрансферазы (ЛХАТ) — фермента, превращающего свободный холестерин ЛПВП в эфиры холестерина, являющиеся его более гидрофобной формой. В силу высокой гидрофобности холестерин, превращенный в эфиры холестерина, перемещается с поверхности липопротеина в ядро. Освобождая место на поверхности частицы для захвата нового свободного холестерина, эта реакция является чрезвычайно важной для процесса очищения периферических тканей от холестерина (обратного транспорта холестерина). Таким образом, фукоидан способен регулировать дислипидемию, вероятно, путем ограничения абсорбции липидов (ОХС и желчных кислот), активировать метаболические ферменты (ЛП, НЛ, ЛХАТ) и повышать экспрессию рецепторов ЛПНП на клетках печени.

Сульфатированные полисахариды и экстракты водоросли *Ulva latuca* обеспечивали энзиматическую (каталаза, глутатионпероксидаза, супероксиддисмутаза) и неэнзиматическую антиоксидантную защиту у крыс с гиперхолестеринемией. При этом у животных, получавших полисахариды, снижался уровень общих липидов (-61%), ОХ (-49,6%), ТГ (-66%), ЛПНП (-93%) по сравнению с контрольными животными. Использование экстракта водоросли значительно увеличивало уровень ЛПВП в сыворотке крови (+180%). Кроме того экстракт значительно снижал атерогенный индекс — в такой же степени, как аторвастатин (-94% и -92,4% соответственно) по сравнению с контролем (животные с гиперхолестеринемией). Следует отметить и еще одну немаловажную деталь. Цитозольные ферменты лактатдегидрогеназа и креатининкиназа являются диагностическими маркерами повреждения тканей. Они по-

падают в ток крови, когда нарушена проницаемость клеточных мембран. Повышение уровня этих ферментов в сыворотках крыс с гиперхолестеринемией отражает, таким образом, нарушение целостности мембран клеток и/или их проницаемости. У животных, получавших экстракт водоросли, полисахарид или аторвастатин уровень этих маркеров снижается в сыворотке крови, что свидетельствует, скорее всего, о стабилизации мембран клеток и ограничении выхода ферментов из них.

Фукоиданы, полученные из бурых водорослей, и фукоаны, выделенные из морских иглокожих, способны оказывать профилактический и лечебный эффект при экспериментальном жировом гепатозе у крыс (Wu et al., 2011), поскольку они значительно снижают уровень триглицеридов в печени, а также ОХ в сыворотке крови ($p < 0,01$). Такие результаты свидетельствуют о том, что фукоаны как из бурых водорослей, так и из морских беспозвоночных могут быть перспективными кандидатами для разработки средств коррекции липидного обмена при этой болезни.

Хороший липидснижающий эффект на крысах с гиперлипидемией получен при совместном использовании сухого порошка водоросли *Undaria pinnatifida* и рыбного жира (Murata et al., 2002), которые действуют на организм синергично. Это касалось как ТГ сыворотки крови, так и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Биомасса водоросли в сочетании с рыбным жиром оказывает действие на β -окисление жирных кислот в печени, что определялось по активности 3-гидрокси-ацил-СоА-дегидрогеназы. В опыте увеличение составило 381%.

Повышение уровня липопротеинлипазы и лецитин-холестерол-ацил-трансферазы при использовании для лечения крыс с гиперлипидемией фукоидана из *Saccharina japonica* описано в работе (Huang et al., 2010). Этот же полисахарид снижал уровень ОХ и ТГ в сыворотке крови.

В работе (Inoue et al., 2009) сделана попытка объяснить механизм липидснижающего действия порфирана — СПС из красной водоросли. Известно, что для процесса метаболизма липидов требуется ряд белков с различными функциями. Эти белки с их генами также являются компонентами системы метаболизма липидов. ЛПНП переносят 60—70% всего холестерина крови. Они содержат один апобелок — аполипопротеин В100 (Апо-В100). Это единственный белок в составе самого атерогенного липопротеина — ЛПНП, ЛПОНП и хиломикрон. Повышенная концентрация Апо-В при нормальном уровне липидов является сильным предиктором развития ИБС, особенно у лиц моложе 40 лет (Hidari et al., 2001). Установлено, что порфиран значительно снижает уровень Апо-В в сыворотке крови. Эти результаты проливают свет на механизм липидснижающего действия порфирана, обусловленный его влиянием

на синтез Апо-В100.

Как известно, ожирение является хроническим нарушением метаболизма липидов, причина которого — отсутствие равновесия между потребляемой и расходуемой энергией. Ожирение — фактор риска многих хронических болезней и метаболического синдрома. В целом, ожирение ассоциируется со степенью дифференцировки адипоцитов, накоплением внутриклеточных липидов и липолизом (Shi, Burn, 2004).

Сульфатированные полисахариды, в частности, фукоидан, могут подавлять накопление жира путем снижения уровня экспрессии генов аР2, Асс и 3ЗФК γ (Kim et al., 2009). Фукоидан ингибирует дифференцировку адипоцитов, доказательством чего является снижение накопления в них жира, и регуляция экспрессии маркеров адипоцитов через MAPK сигнальный путь.

В 2011 году появилось сообщение М.К. Park et al. об ингибирующем эффекте фукоидана на аккумуляцию липидов путем регуляции уровня гормончувствительной липазы (HSL), которая является ограничивающим ферментом, обеспечивающим гидролиз ТГ жирных кислот. Накопление липидов под действием фукоидана снижалось на 16,5% при дозе фукоидана 100 мкг/мл и на 52,2% — при дозе 200 мкг/мл. Одновременно было отмечено снижение уровня ТГ в адипоцитах на 86% по сравнению с контролем. При использовании фукоидана в дозе 200 мкг/мл уровень HSL и pHSL возрастал в 1,47 и 1,59 раза соответственно по сравнению с контрольными показателями. Эти исследования свидетельствуют о том, что фукоидан может индуцировать липолиз в адипоцитах путем усиления синтеза HSL и pHSL. Эти же авторы при использовании меченой глюкозы установили, что фукоидан ингибирует накопление липидов и путем снижения уровня глюкозы.

Проведены исследования влияния молекулярной массы полисахаридов на проявление их липидснижающего действия (Pengzhan et al., 2003). В экспериментах на крысах с гиперлипидемией были использованы фракции ульвана — СПС из зеленой водоросли *Ulva pertusa* — U1 и U2. Молекулярная масса варьировала от 15,6 до 28,2 кДа. Высокомолекулярный ульван был более эффективен в снижении в сыворотке крови ОХ (-45%) и ЛПНП (-54,1%), низкомолекулярный — в повышении ЛПВП (+61%) и снижении ТГ (-82,4%). Авторы рекомендуют использовать обе фракции у пациентов с гиперлипидемией и диабетом.

Полисахарид из красной водоросли снижал в сыворотке крови уровень общих липидов, ОХ, ТГ и ЛПНП на 48%, 49,6%, 63% и 80,6% соответственно. Уровень ЛПВП возрастал в 1,14 раза по сравнению с животными, не получавшими полисахарида. Полисахарид из бурой водоросли снижал

общие липиды, ОХ, ТГИ и ЛПНП на 25,5%, 49%, 51% и 91% соответственно. Уровень ЛПВП возрастал в 1,5% раза по сравнению с контролем. В группе крыс с гиперхолестеринемией наблюдалось значительное повышение уровня АЛТ и АСТ в сыворотках крови. Употребление экстрактов водорослей *A. spicifera*, *C. trinode* и аторвастатина снижало концентрацию этих ферментов. Пероральное применение экстракта *A. spicifera* повышало активность щелочной фосфатазы, а экстракт *C. trinode* и аторвастатин обусловили значительное снижение уровня этого фермента на 3% и 52,6% соответственно по сравнению с контролем.

Добавление в корм крыс с экспериментальной гиперхолестеринемией биомассы различных водорослей (красных, бурых, зеленых) в количестве 5% (Matanjan et al., 2010) приводило к снижению веса тела животных. При этом снижался ОХ (-11,4%-18,5%), ЛПНП (-22%-49%) и ТГ (-33,7%-36,1%). Значительно повышались ЛПВП (16,3%-55%). Уровень изменений показателей зависел от вида водоросли. Так, биомасса водоросли *K.alvarezii* показала более выраженное, чем другие гипополипидемическое действие и антиоксидантную активность, а биомасса *C.lintilifera* — более значительно снижала ОХ. Общим для всех водорослей было снижение массы тела животных, глутатионпероксидазы эритроцитов и перекисного окисления липидов.

Снижение ЛПНП под действием полисахаридов обусловлено, по-видимому, антиоксидантными свойствами этих соединений, которые способны ингибировать пероксидацию ЛПНП (Chang-Hu et al., 2001). Сульфатные компоненты экстрактов водорослей уменьшают чрезмерное накопление ТГ (Dianzani, 1978). Кроме того, сульфатированные полисахариды снижают абсорбцию холестерина в кишечнике. Гистологическая картина печени животных первой контрольной группы (интактные крысы), была обычной, в то время как у крыс с гиперхолестеринемией имели место воспалительные изменения вокруг портальной триады с пестрой микровезикулярной жировой дегенерацией. У животных, получавших полисахариды из *A. spicifera* и *C. trinode*, отмечалась нормализация картины органа, почти такая, как в контроле.

Несколько иные данные сообщались ранее (Wong et al., 1999). Речь в этой работе идет об экстрактах других водорослей — *E.cava*, *Colpomenia sinuosa* и *Sargassum hemiphyllum*. Эти биологически активные продукты не снижали ОХ сыворотки крови крыс с гиперхолестеринемией, а, наоборот, повышали эндогенный синтез холестерина в печени.

Такие разноплановые результаты свидетельствуют о том, что для разработки лекарственных препаратов и БАД на основе морских водорослей необходимы тщательные доклинические исследования и всесторонний

сравнительный анализ полученных материалов.

Липидснижающее действие каррагинана установлено при включении его в рацион питания 20 человек добровольцев (Panlasigui et al., 2003). Каждая фаза в контроле и опыте продолжалась 8 недель с перерывом в две недели. Пациенты контрольной группы ПС не получали. Кровь у пациентов брали до начала опыта и после каждой его фазы. Применение каррагинана позволило снизить ОХС с 5,44 ммоль/л до 3,64 ммоль/л, а ТГ — с 1,28 ммоль/л до 0,87 ммоль/л. Уровень ЛПВП у пациентов опытной группы вырос с 1,25 ммоль/л до 1,65 ммоль/л. Содержание в сыворотке крови ЛПНП отличалось у пациентов обеих групп незначительно (в контроле — $3,25 \pm 1,96$ ммоль/л, в опыте — $3,07 \pm 1,64$ ммоль/л). У пациентов опытной группы несколько снизился вес тела ($60,33 \pm 12,06$ кг против $61,11 \pm 12,33$ кг). Снижение веса пациентов под действием каррагинана авторы объясняют действием этого полисахарида как источника пищевых волокон, которые связывают желчные кислоты и холестерин в тонком кишечнике, что приводит к стимуляции образования их в печени за счет деградации холестерина, поступающего сюда в виде атерогенных липопротеидов (Li et al., 2008). В свою очередь, снижение уровня общего холестерина и ЛПНП в крови способствует поступлению в нее холестерина из тканей, в том числе из артерий (Пискун и др., 1998). Снижение веса пациентов опытной группы коррелировало с положительной динамикой липидного профиля сыворотки крови. Близкие результаты получены другими авторами (Dattilo, Khris- Etherton, 1992; Andersen et al., 1995).

Уровень сывороточного холестерина может изменяться в зависимости от объема и плотности пищи, что имеет большое значение для скорости переваривания пищи и абсорбции нутриентов. Пищевые волокна обеспечивают объем, так как они не перевариваются и транзитом проходят через тонкий кишечник. Следует иметь в виду, что каррагинаны хорошо поглощают воду и тем самым еще больше увеличивают свой объем и вязкость содержимого кишечника, что также влияет на количество всосавшегося холестерина.

Многочисленные экспериментальные, клинические и эпидемиологические данные убедительно свидетельствуют о ключевой роли дислипидемий (ДЛП) в патогенезе атеросклероза и его клинических проявлений. Перспективные клинические исследования показали, что профилактика ДЛП у лиц из группы риска ишемической болезнью сердца (ИБС) и их лечение у больных ИБС замедляет рост атеросклеротических бляшек и даже вызывает их регрессию. Назначение липидснижающих препаратов является одним из основных принципов терапии ИБС, поскольку они улучшают выживаемость пациентов и отдаленный прогноз,

а также снижают риск развития сосудистых катастроф. Из лекарств, нормализующих липидный спектр крови, наиболее эффективными препаратами, имеющими огромную доказательную базу, являются статины. Поэтому именно они составляют основу лечения ИБС в плане коррекции нарушений липидного обмена. Внедрение статинов (аторвастатина, ловастатина, правастатина и др.), в первую очередь, связано с тем, что они способны угнетать активность ключевого фермента синтеза холестерина (ХС) в печени — 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы (ГМГ-КоА-редуктаза, КФ 1.1.1.34). Торможение синтеза ХС в печени ведет к уменьшению ХС в липопротеинах очень низкой плотности (ЛПОНП) и, далее, к снижению ХС в липопротеинах низкой плотности (ЛПНП). Это способствует увеличению рецепторного захвата ЛПНП клетками из циркулирующей крови, активизирует метаболизм хиломикронов, снижает его уровень в плазме. Положительное влияние статинов связано также и с дополнительными, так называемыми, плейотропными эффектами: сосудорасширяющее действие, улучшение функции эндотелия, стабилизация атеросклеротических бляшек, противовоспалительный эффект (Липовецкий, 2004; Гуревич, 2003). По данным Европейского исследования EUROASPIRE, в котором ведется наблюдение за динамикой факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний, в Европе назначение статинов за последнее десятилетие возросло с 32,2% до 88,8%. Многочисленными исследованиями установлено, что большинство лекарственных препаратов, используемых для профилактики и лечения атеросклероза, обладают неблагоприятными побочными эффектами, особенно на метаболическую функцию печени, что затрудняет их применение и обуславливает все возрастающий интерес к немедикаментозным гиполлипидемическим средствам.

Авторами настоящего раздела работы проведена оценка влияния БАД «Фуколам» на липидный спектр крови пациентов с ИБС (стабильная стенокардия II-III функционального класса - ИБС II – III ФК). Методом случайной выборки проведено проспективное рандомизированное исследование показателей липидного обмена у 40 пациентов с ИБС II – III ФК, находящихся на лечении в терапевтическом отделении МО ДВО РАН и 20 пациентов контрольной группы (практически здоровые) в возрасте 45-60 лет. Все обследуемые пациенты были разделены на 2 группы: 1 группа — контроль (здоровые), 2 группа — больные ИБС, 2а группа — пациенты получали базисную терапию (БТ) (10 мг аторвастатина) и «Фуколам», 2б группа — пациенты получали БТ (без аторвастатина) и «Фуколам». Базисная терапия включала препараты калия, селективные бета-блокаторы, антагонисты кальция, аспирин, статины (по назначе-

нию). Лечение сердечной недостаточности проводили традиционными методами без каких-либо ограничений. Пациенты, отказавшиеся принимать статины или имеющие противопоказания (группа 2б), получали БАД «Фуколам» по 1 капсуле (500 мг) 1 раз в день. После проведенного курса лечения в стационаре больные были выписаны домой и в зависимости от проведенного лечения, было рекомендовано продолжать прием этих препаратов до 6 месяцев от начала лечения.

Протокол исследования был утвержден Комитетом по биомедицинской этике МО ДВО РАН. Пациентов принимали в группу после подписания информированного согласия на участие в исследовании. Клинико-лабораторное обследование пациенты проходили до начала лечения, после лечения, в динамике приема препаратов (через 1, 3, 6 месяцев) после начала лечения. Всем пациентам проводили анализ крови на липидный спектр: общий холестерин (ХС общий), холестерин липопротеинов высокой, очень низкой и низкой плотности (ХС-ЛПВП, ХС-ЛПОНП, ХС-ЛПНП), триглицериды (ТГ), коэффициент атерогенности (КА). Также исследовали величины аполипопротеинов: А (апо А), В (апо В) и липопротеин (а) — ЛП (а). Знание метаболизма липидов и липопротеинов в норме позволяет лучше представлять механизмы тех нарушений, которые лежат в основе наиболее часто встречающихся дислипидемий, и более целенаправленно проводить коррекцию этих нарушений. Для понимания механизма было проведено исследование методом микротонкослойной хроматографии (ТСХ) липидных составляющих липопротеинов (нейтральные липиды и фосфолипиды), которые отражают глубину нарушений липидного обмена.

Липидный состав плазмы крови больных ИБС до лечения

Клинико-биохимические показатели плазмы крови больных ИБС и их сравнение с таковыми показателями у здоровых лиц представлены в таблице 7.1. У больных в плазме крови отмечается снижение количества общих фосфолипидов на 15% ($p < 0,05$) и увеличение общего холестерина на 51% ($p < 0,001$). Следует отметить, что величина апо А (апопротеин ЛПВП) была ниже контрольного значения на 14% ($p < 0,01$), а апо В (апопротеин ЛПНП) превышало таковой на 31% ($p < 0,001$). При этом уровень ХС ЛПНП был выше контроля на 63% ($p < 0,001$), а ХС ЛПОНП на 21%. Следовательно, повышение ХС происходило за счёт его атерогенных фракций. Следует заметить, что величина ХС ЛПВП была выше показателей контроля и находилась в пределах норм метода.

Таблица 7.1

Биохимические показатели крови больных ИБС и здоровых лиц (M±m)

Показатели	Контроль	Больные ИБС до лечения	% изменений от контроля
Общие ФЛ (%)	4,00±0,23	3,40±0,211	-15
апо А (мг/дл)	154,6±5,7	132,78±4,802	-14
апо В (мг/дл)	117,2±6,0	153,28±6,813	+31
апо В/апо А	0,75±0,02	1,07±0,02	+43
ЛП (а) (мг/дл)	23,33±1,75	70,70±16,72 ³	+203
ХС общий (моль/л)	4,31±0,19	6,49±0,263	+51
ХС ЛПОНП (ммоль/л)	0,57±0,04	0,69±0,09	+21
ХС ЛПНП (моль/л)	2,60±0,15	4,25±0,173	+63
ХС ЛПВП (моль/л)	1,17±0,05	1,47±0,15	+26
Коэффициент атерогенности	2,66±0,10	3,74±0,481	+41

Обращает на себя внимание превышение значения ЛП(а) в 3,03 раза. Расчет коэффициента соотношения апо В/апо А показал его увеличение на 43% ($p < 0,01$), а коэффициента атерогенности на 41% ($p < 0,05$).

Нейтральные липиды. В составе нейтральных липидов плазмы крови определено 5 фракций (рис. 7.1): триглицериды (ТГ), свободные жир-

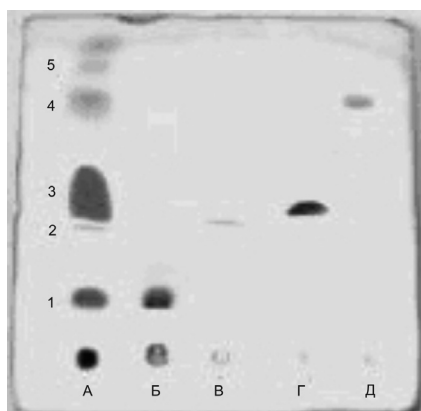


Рис. 7.1. Хроматограмма нейтральных липидов экстракта из плазмы крови. Система растворителей: петролейный эфир : серный эфир : уксусная кислота (90 : 10 : 1 по объему). Условные обозначения: 1 — холестерин, 2 — свободные жирные кислоты, 3 — триглицериды, 4 — эфиры жирных кислот, 5 — эфиры холестерина. А — липидный экстракт из плазмы крови, Б — стандарт холестерина, В — стандарт стеариновой кислоты, Г — стандарт тристеарата, Д — стандарт метиловых эфиров жирных кислот

ные кислоты (СЖК), эфиры жирных кислот (ЭЖК), холестерин (ХС) и эфиры холестерина (ЭХС).

На рисунке 7.2 представлены изменения фракций нейтральных липидов в плазме крови у больных ИБС по сравнению с контрольными показателями.

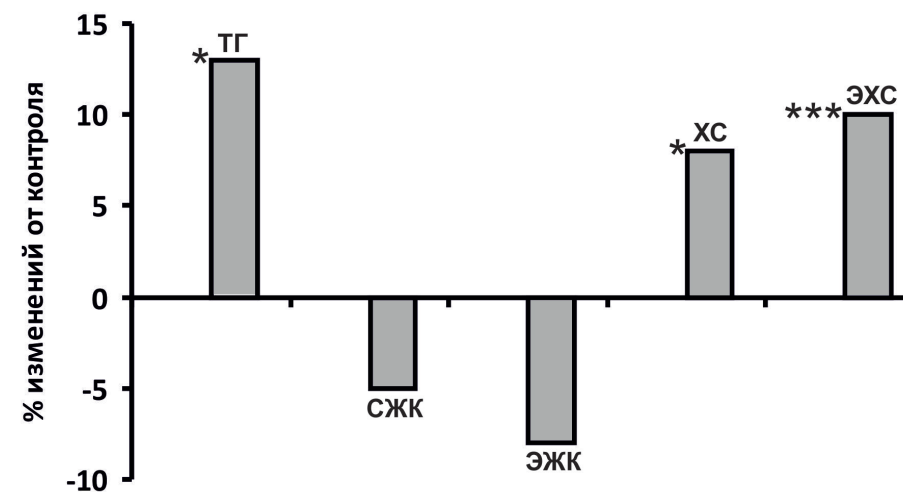


Рис. 7.2. Изменения в содержании липидных фракций в плазме крови больных ИБС. * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$

Как видно на рисунке 7.2, в плазме крови больных выражена гипертриглицеринемия и гиперхолестеринемия. Так, уровень триглицеридов (ТГ) был увеличен на 13%, что составляло $18,03 \pm 0,51\%$ по сравнению с $16,00 \pm 0,58\%$ в контроле ($p < 0,05$). Количество неэтерифицированного холестерина (ХС) было выше контрольного уровня на 8% ($18,96 \pm 0,53\%$ против $17,63 \pm 0,50\%$; $p < 0,05$), а количество эфиров холестерина (ЭХС) увеличено на 10% ($p < 0,001$), что составляло $31,54 \pm 0,46\%$ по сравнению с $28,75 \pm 1,37\%$ в контроле.

Известно, что у больных ИБС в крови наблюдается высокое содержание ЛПОНП и ЛПНП, богатых триглицеридами и холестерином (Ежов и др., 2001; Липовецкий, Чураков, 2001), то есть, отмеченная нами гипертриглицеринемия и гиперхолестеринемия, а также низкое содержание общих фосфолипидов обусловлены именно этими факторами. Общий холестерин плазмы крови складывается из двух фракций: неэтерифицированный или альфахолестерин, этерифицированный холестерин или эфиры холестерина. Эфиры холестерина в крови в норме преимущественно находятся в составе ЛПНП (до 50%) и ЛПВП (до 20%). Этерификация

холестерина происходит как в ЛПВП, так и в ЛПНП при участии ЛХАТ (лецитин:холестерин-ацилтрансфераза) (Никифорова, 1981; Климов, Никульчева, 1995). Тот факт, что в плазме крови обследованных нами больных ИБС отмечалось увеличение апо В, являющегося белковой частью ЛПНП, а также увеличение ХС ЛПНП и ЛПОНП, косвенно свидетельствует о высокой концентрации данной фракции липопротеинов. При этом наибольший процент от общего холестерина занимают эфиры холестерина (увеличение на 10%). Высокая концентрация холестерина в крови обусловила повышение коэффициента атерогенности.

Подтверждением этих предположений является известный факт о том, что изменения в интима и меди артерий при развитии атеросклероза обусловлены массивным отложением этерифицированного холестерина в составе так называемых «пенистых» клеток. При этом основная масса эфиров холестерина в бляшке при атеросклерозе происходит из циркулирующих в крови ЛПНП (Esterbauer et al., 1993).

Фосфолипиды

В составе фосфолипидов плазмы крови определено 8 фракций (рис. 7.3): фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), сфингомиелин (СМ), фосфатидилэтанолламин (ФЭ), лизофосфатидилэтанолламин (ЛФЭ), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозит (ФИ), дифосфатидилглицерин (ДФГ).

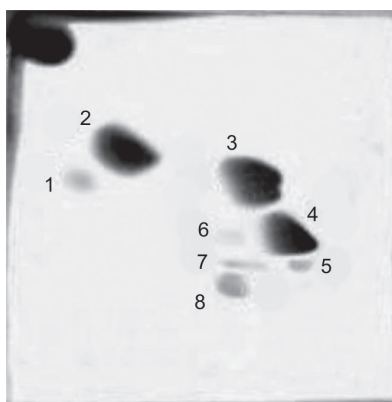


Рис. 7.3. Хроматограмма фосфолипидных фракций экстракта из плазмы крови. Системы растворителей: 1-е направление — хлороформ : метанол : аммиак (65 : 25 : 5 по объему); 2-е направление — хлороформ : ацетон : метанол : уксусная кислота : вода (30 : 40 : 10 : 5 по объему). Условные обозначения: 1 — дифосфатидилглицерин, 2 — фосфатидилэтанолламин, 3 — фосфатидилхолин, 4 — сфингомиелин, 5 — лизофосфатидилхолин, 6 — лизофосфатидилэтанолламин, 7 — фосфатидилинозит, 8 — фосфатидилсерин

Сравнительный анализ величин фосфолипидных фракций плазмы крови больных ИБС (рис. 7.4) с таковыми в контроле показал, что среди холинсодержащих фракций отмечалось снижение количества фосфатидилхолина (ФХ) на 12% ($40,55 \pm 0,63\%$ против $46,14 \pm 0,76\%$ в контроле; $p < 0,001$) при одновременном увеличении лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 37% ($15,07 \pm 0,42\%$ против $11,00 \pm 0,32\%$ в контроле; $p < 0,001$) и сфингомиелина (СМ) на 18% ($15,37 \pm 0,22\%$ против $13,00 \pm 0,49\%$; $p < 0,001$).

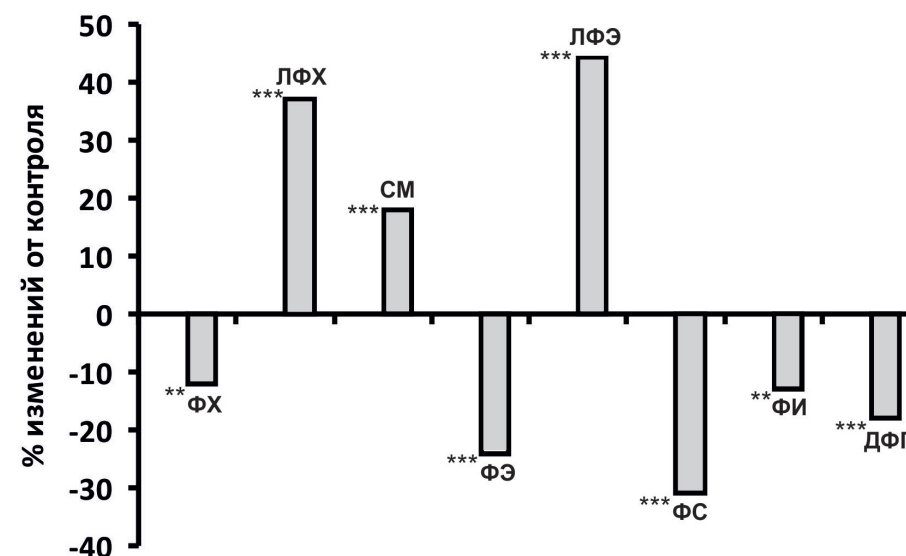


Рис. 7.4. Изменения в содержании фосфолипидных фракций в плазме крови больных ИБС. ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$.

В составе этаноламиновых фракций фосфолипидов отмечалось снижение количества фосфатидилэтанолламина (ФЭ) на 24% ($p < 0,001$), что составляло $6,34 \pm 0,37\%$ по сравнению с $8,44 \pm 0,42\%$ в контроле, а также фосфатидилсерина (ФС) на 31% ($p < 0,01$), что составляло $3,43 \pm 0,31\%$ по сравнению с $5,00 \pm 0,32\%$. Одновременно происходило увеличение лизофосфатидилэтанолламина (ЛФЭ) на 44% ($8,82 \pm 0,21\%$ против $6,13 \pm 0,43\%$ в контроле; $p < 0,001$). Следует отметить снижение содержания метаболически активных фракций фосфолипидов. Так, количество фосфатидилсерина (ФС) в плазме крови больных было снижено на 31% ($3,43 \pm 0,31\%$ против $5,00 \pm 0,32\%$ в контроле; $p < 0,01$), фосфатидилинозита (ФИ) на 13% ($5,31 \pm 0,28\%$ против $6,10 \pm 0,11\%$ в контроле; $p < 0,05$), дифосфатидилглицерина (ДФГ) на 18% ($5,05 \pm 0,11\%$ против $6,19 \pm 0,24\%$ в контроле; $p < 0,001$).

Снижение количества ФХ и ФЭ при одновременном увеличении их лизоформ обусловлено активацией фосфолипазы A_2 (Satoh et al., 1993). Увеличение количества СМ является компенсаторной реакцией на сни-

жение ФХ, так как оба фосфолипида принадлежат к одному классу холинсодержащих фракций (Грибанов, 1979). Снижение содержания метаболически активных фракций фосфолипидов (ФС, ФИ, ДФГ) может быть объяснено также активацией фосфолипаз. Это является негативным фактором, так как эти фосфолипиды необходимы для функционирования Na⁺-K⁺-насоса, ферментов дыхательной цепи митохондрий при синтезе АТФ, моноаминоксидазы и других (Бурлакова, 1977). Кроме того, так как в их составе преимущественно находятся ненасыщенные жирные кислоты (арахидоновая, эйкозапентаеновая и докозагексаеновая), то возможно, снижение этих фосфолипидов также может быть связано с дефицитом ненасыщенных жирных кислот. Снижение фосфолипидных фракций в плазме крови, являющихся основными структурными компонентами клеточных мембран (ФХ и ФЭ), свидетельствует о нарушениях в структуре мембран эритроцитов, интима сосудов (Курилович и др., 2009), то есть в липидной составляющей мембран увеличивается доля холестерина.

Таким образом, у больных ИБС в плазме крови отмечается дислиппротеинемия (высокий уровень ЛПОНП и ЛПНП), гипертриглицеринемия, гиперхолестеринемия и рассогласование фосфолипидного состава, что приводит к замене фосфолипидных фракций в мембранах на холестерин. Подтверждением диагноза ИБС является как увеличение коэффициента соотношения апо В/апо А1, коэффициента атерогенности, так и увеличение ЛП(а) в 3,03 раза.

Влияние лечения базовой терапией с аторвастатином (10 мг) и фуколамом (БТ+статины 10 мг+фуколам) на липидный состав плазмы крови больных ИБС

При сравнении изученных клинико-биохимических показателей у больных ИБС после лечения БТ+статины (10 мг)+фуколам с таковыми до лечения (табл. 7.2) отмечалось статистически достоверное снижение общего холестерина на 19% (p<0,05), ХС ЛПОНП на 28% (p<0,05), ХС ЛПНП на 24% (p<0,01) по сравнению с таковыми величинами до лечения. Значение ХС ЛПВП оставалось на уровне контроля.

Таблица 7.2

Биохимические показатели плазмы крови больных ИБС до и после лечения (M±m)

Показатели	До лечения	После лечения	% изменений от контроля
Общие ФЛ(%)	3,40±0,21	4,15±0,271	+22

ХС общий (моль/л)	6,43±0,25	5,22±0,271	-19
ХС ЛПОНП (ммоль/л)	0,61±0,06	0,44±0,031	-28
ХС ЛПНП (моль/л)	4,26±0,17	3,24±0,302	-24
ХС ЛПВП (моль/л)	1,50±0,11	1,48±0,10	-1

Примечание: различия статистически достоверны по сравнению с группой до лечения при: ¹ – p<0,05; ² – p<0,01.

Количество общих фосфолипидов (ФЛ) после лечения относительно таковых показателей до лечения увеличилось на 22% (p<0,05). Таким образом, лечение БТ+статины+фуколам способствовало снижению уровня атерогенного холестерина в плазме крови. После проведенного курса лечения базовой терапией с аторвастатином (10 мг) и «Фуколамом» (БТ+статины 10 мг+фуколам) в плазме крови больных ИБС отмечалось изменение липидного состава по сравнению с таковыми величинами до лечения (рис. 7.5). Это проявлялось в снижении ТГ на 9% (16,37±0,29%; p<0,001) и увеличении количества ЭЖК на 9% (15,73±0,44%; p<0,05).

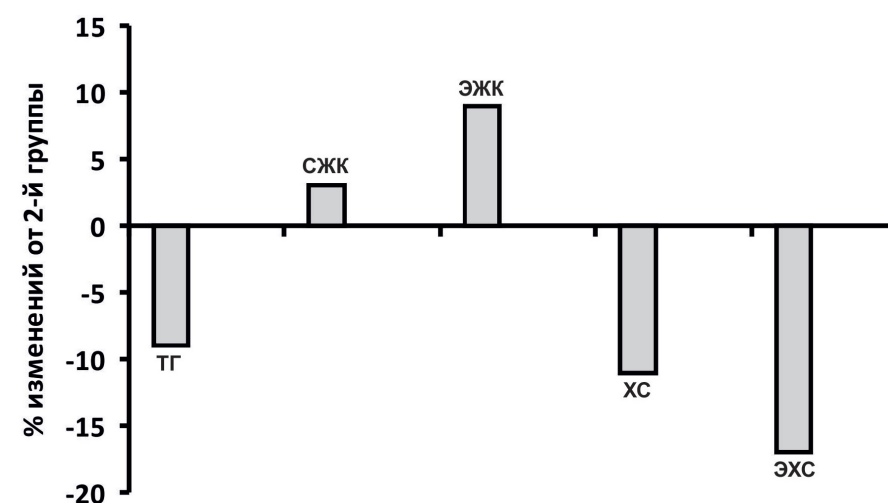


Рис. 7.5. Изменения липидного состава плазмы крови у больных ИБС после лечения БТ+статины 10 мг+фуколам по сравнению со 2-й группой (до лечения). *** – p<0,001

В то же время количество неэтерифицированного ХС снизилось на 11% (16,80±0,43%; p<0,001), а ЭХС на 17% (26,07±0,90%; p<0,001).

Исследование фосфолипидного состава плазмы крови после курса лечения БТ+статины 10 мг+фуколам показало изменения их количественных характеристик (рис. 7.6).

Таблица 7.3

Биохимические показатели плазмы крови больных ИБС до и после лечения (M±m)

Показатели	До лечения	После лечения	% изменений
Общие ФЛ(%)	3,40±0,21	4,20±0,242	+24
ХС общий (моль/л)	6,53±0,26	5,25±0,312	-20
ХС ЛПНП (моль/л)	4,24±0,35	3,08±0,292	-27
ХС ЛПВП (моль/л)	1,45±0,12	1,48±0,12	-2

Примечание: различия статистически достоверны по сравнению со 2-й группой (до лечения) при: ¹- p<0,05; ²- p<0,01.

После проведенного курса лечения базовой терапией с фуколамом (БТ+фуколам) в плазме крови больных ИБС отмечались изменения количественных характеристик фракций нейтральных липидов (ТГ, ХС, ЭХС) по сравнению с таковыми величинами до лечения (2 группа) (рис. 7.7).

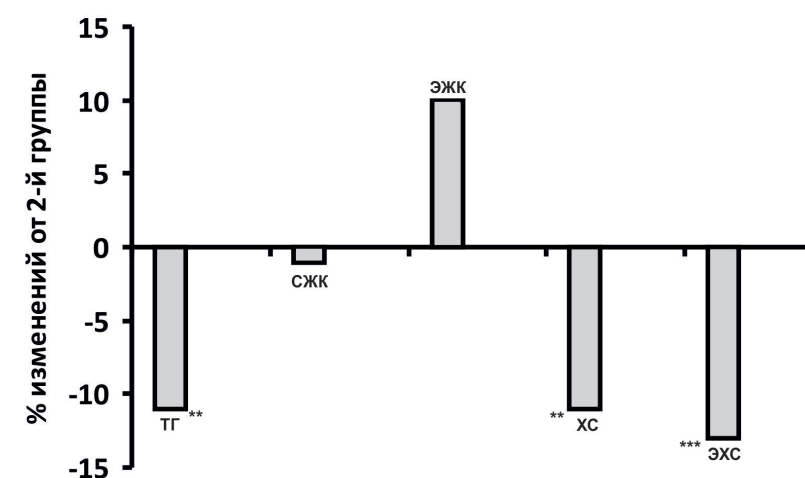


Рис. 7.7. Изменения липидного состава плазмы крови у больных ИБС после лечения БТ+фуколам по сравнению со 2-й группой (до лечения). ** – p<0,01; *** – p<0,001

Так, количество ТГ снизилось на 11% (p<0,01), что составляло 16,06±0,46%. При этом количество неэтерифицированного холестерина (ХС) уменьшилось на 11% (17,41±0,45%; p<0,01) при одновременном снижении ЭХС на 13% (27,37±0,29%; p<0,001).

Таким образом, лечение по схеме БТ+фуколам сопровождалось снятием дислипидотеинемии, снижением атерогенного холестерина (ЭХС и ХС

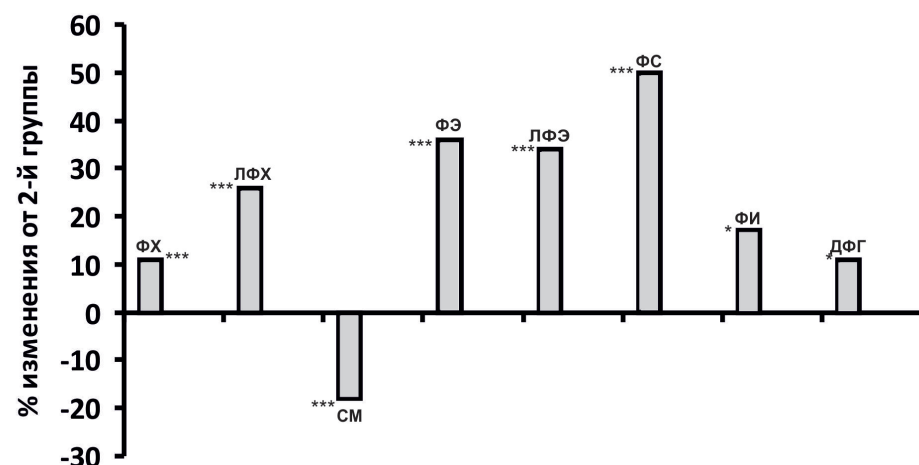


Рис. 7.6. Изменения в содержании фосфолипидных фракций в плазме крови после лечения БТ+статин (10 мг)+фуколам по сравнению со 2-й группой (до лечения). * – p<0,05; *** – p<0,001

Так, в плазме крови увеличилось количества ФХ на 11% (p<0,001), что составляло 45,11±0,71% при одновременном снижении ЛФХ на 26% (p<0,001) и СМ на 18% (p<0,001), что, соответственно, составляло 10,94±0,32% и 12,29±0,31%. Количество ФЭ возросло на 36% (p<0,001), тогда как ЛФЭ снизилось на 34% (p<0,001), что, соответственно, составляло 8,49±0,33% и 5,93±0,17%. Следует отметить увеличение метаболически активных фракций: количество ФС на 50% (p<0,001), ФИ на 17% (p<0,05), ДФГ на 11% (p<0,05) (5,51±0,33%; 6,14±0,22%; 5,59±0,17%, соответственно).

То есть, после проведенного курса лечения БТ+статин+фуколам была купирована дислипидотеинемия, нормализовался уровень холестерина, триглицеридов и фосфолипидов в плазме крови.

Влияние лечения базовой терапией с фуколамом (БТ+фуколам) на липидный состав плазмы крови больных ИБС

Как видно из таблицы 7.3, в плазме крови больных после лечения отмечалось статистически достоверное увеличение общих фосфолипидов на 24% (p<0,01), снижение общего холестерина на 20% (p<0,01), ХС ЛПНП на 27% (p<0,01). Величина ХС ЛПВП оставалась на уровне контроля.

ЛПНП), увеличением общих фосфолипидов.

Исследование фосфолипидного состава плазмы крови после курса лечения БТ+фуколам по сравнению с таковыми показателями до лечения показало изменения их количественных характеристик (рис. 7.8).

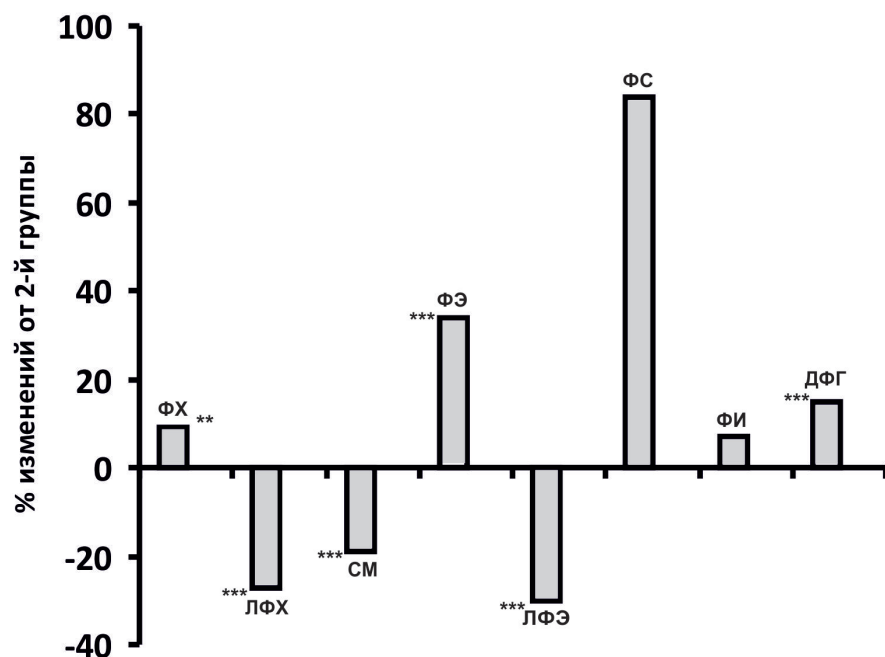


Рис. 7.8. Изменения в содержании фосфолипидных фракций в плазме крови после лечения БТ+фуколам по сравнению со 2-й группой (до лечения). ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

Увеличение количества ФХ на 9% ($p < 0,001$) сопровождалось снижением ЛФХ на 27% ($p < 0,001$) и СМ на 19% ($p < 0,001$). Это, соответственно, составляло $43,97 \pm 0,95\%$, $11,19 \pm 0,35\%$ и $12,67 \pm 0,33\%$. Количество ФЭ возросло на 34% ($p < 0,001$), тогда как ЛФЭ снизилось на 30% ($p < 0,001$), что, соответственно, составляло $8,83 \pm 0,22\%$ и $6,08 \pm 0,11\%$. Среди метаболически активных фракций количество ФС увеличилось на 84% ($p < 0,001$), ФИ на 7%, ДФГ на 15% ($p < 0,001$) ($5,71 \pm 0,32\%$; $5,73 \pm 0,09\%$; $5,82 \pm 0,13\%$, соответственно). В результате после проведенного курса лечения по схеме БТ+фуколам нормализовалось соотношение фосфолипидных фракций в плазме крови.

Таким образом, введение фуколама в терапию больных ИБС способствует снятию дислипидотеинемии, снижению атерогенного холестерина, нормализации уровней триглицеридов, восстановлению соотношения фракций нейтральных липидов и фосфолипидов.

Сравнительная оценка влияния схемы лечения на изменения липидных фракций в плазме крови больных ИБС

Было проведено сравнение процентных отклонений, вычисленных между исследованными показателями до лечения и после лечения с использованием двух схем лечения (БТ+статины+фуколам и БТ+фуколам).

Как видно на рисунке 7.9, лечение БТ+статины+фуколам и БТ+фуколам по сравнению с таковыми показателями до лечения показало различные эффекты их действия. Так, при лечении БТ+статины+фуколам более значительно снизилось количество ХС (на 11%, $p < 0,001$) и ЭХС (на 17%, $p < 0,001$), отмечалось также снижение ТГ (на 9%, $p < 0,01$), то есть, схема лечения БТ+статины+фуколам эффективно влияла на обмен холестерина. При лечении БТ+фуколам отмечалось более значительное снижение ТГ (на 11%, $p < 0,01$).

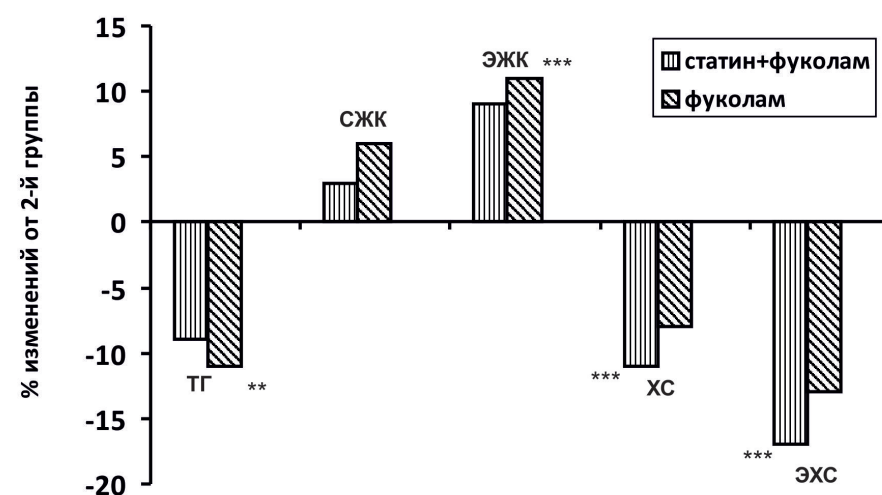


Рис. 7.9. Изменения липидного состава плазмы крови у больных ИБС после лечения БТ+статины+фуколам и БТ+фуколам по сравнению со 2-й группой (до лечения).

** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$

Эта схема лечения также влияла на обмен холестерина: снижение ХС на 8% ($p < 0,001$), ЭХС на 13% ($p < 0,001$). То есть, направленность в восстановлении нарушенных биохимических параметров при использовании обеих видов терапии была одинаковой, а отличия отмечались только в степени ее выраженности.

Как видно на рисунке 7.10, лечение БТ+статины+фуколам и БТ+фуколам по сравнению с таковыми показателями до лечения показало одинаковую направленность в изменении фосфолипидных фракций, однако степень выраженности этих изменений различалась.

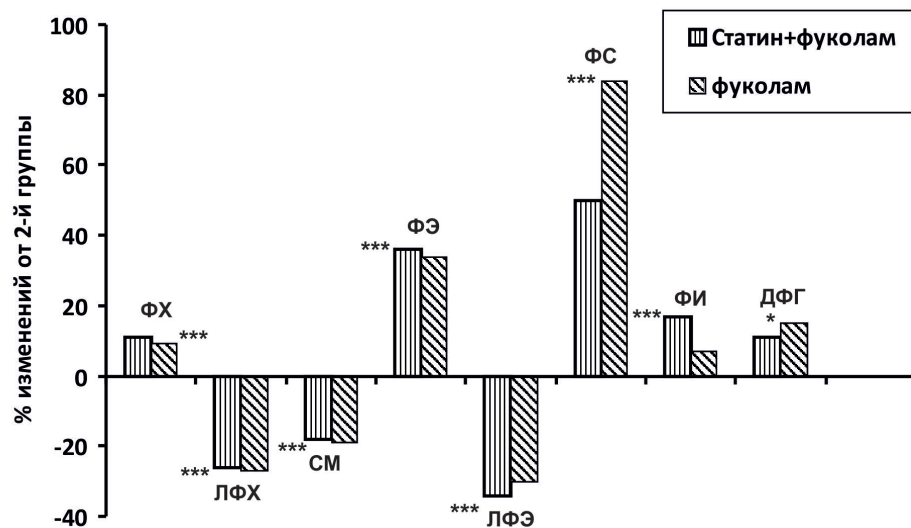


Рис. 7.10. Изменения фосфолипидного состава плазмы крови у больных ИБС после лечения БТ+статин+фуколам и БТ+фуколам по сравнению со 2-й группой (до лечения). * — $p<0,05$; ** — $p<0,01$; *** — $p<0,001$

Так, при лечении БТ+статин+фуколам более значительно увеличилось количество ФХ (на 11%), ФЭ (на 36%, $p<0,001$), ФИ (на 17%, $p<0,001$) и снизилось количество ЛФЭ (на 34%, $p<0,001$). При лечении БТ+фуколам отмечалось более значительное снижение ЛФХ (на 27%, $p<0,001$), СМ (на 19%, $p<0,001$), а также увеличение ФС (на 84%, $p<0,001$) и ДФГ (на 15%, $p<0,01$). Эти результаты свидетельствуют о том, что обе схемы лечения восстанавливали этерифицирующую функцию печени, что способствовало преобразованию ТГ в фосфолипиды. Кроме того, «Фуколам», входящий в состав обеих схем лечения, снижал активность фосфолипаз и этим предотвращал разрушение фосфолипидных фракций.

Таким образом, введение «Фуколама» в схему лечения способствовало восстановлению в соотношении липопротеинов в плазме крови, что обуславливало увеличение возможности выведения холестерина из мембран липопротеинами высокой плотности. В то же время снижение доли холестерина в мембранах способствовало замещению его на фосфолипидные фракции, в частности ФХ и ФЭ. Данный феномен определяет «Фуколам» не только как гипохолестеринемическое средство, но и как эффективное средство для восстановления структуры мембран, нарушенных при ИБС.

Динамика изменений клинко-биохимических показателей липидного спектра крови пациентов с ИБС II–III ФК в течение 6 месяцев на фоне приема препаратов

На рисунке 7.11 представлены результаты эффективности длительного применения «Фуколама» с использованием двух схем лечения (БТ+статин+фуколам и БТ+фуколам) у больных ИБС II–III ФК с дислипидемией. Динамика снижения уровня общего ХС была более выражена в группе 2. Через 3,6 месяцев от начала лечения снижение общего ХС в группе 2а составило 30% ($p<0,001$), 34% ($p<0,001$), а в группе 2б — 17% ($p<0,001$), 24% ($p<0,001$).

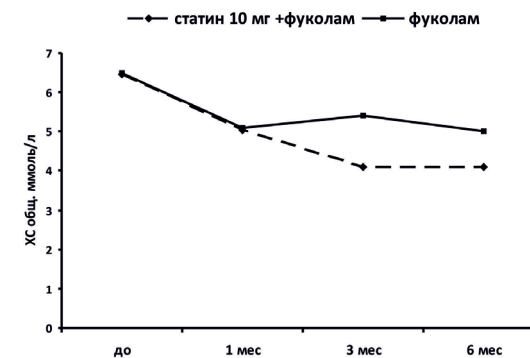


Рис. 7.11. Динамика изменений в содержании общего ХС в сыворотке крови пациентов после лечения (1 месяц) и последующего профилактического применения препаратов (3 и 6 месяцев)

Более заметные изменения проявились в содержании ХС-ЛПНП. Так, через 3, 6 месяцев в группе 2а снижение ХС-ЛПНП составило: 49% ($p<0,001$), 47% ($p<0,001$), в группе 2б — 22% ($p<0,001$), 31% ($p<0,01$), при этом сохранилась тенденция снижения, как и у общего ХС (рис. 7.12).

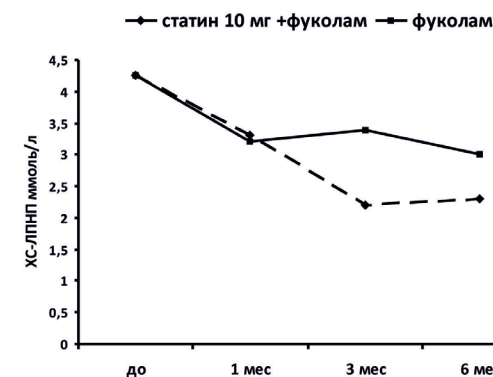


Рис. 7.12. Динамика изменений в содержании ХС – ЛПНП в сыворотке крови после лечения (1 месяц) и последующего профилактического применения препаратов (3 и 6 месяцев)

Европейские липидологи считают, что следует добиваться снижения ХС-ЛПНП при ИБС до 2,6 ммоль/л и ниже, что практически было достигнуто в группе 2а через 3 месяца и пролонгировано до 6 месяцев.

Уровень ХС ЛПВП в динамике в течение 6 месяцев значительно не менялся. Интересным представляется и такой показатель, как содержание не-ЛПВП холестерина (рис. 7.13). Существуют доказательства, что уровень

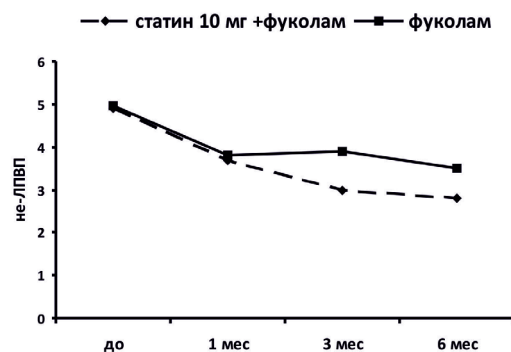


Рис. 7.13. Динамика изменений в содержании не-ЛПВП в сыворотке крови после лечения (1 месяц) и последующего профилактического применения препаратов (3 и 6 месяцев)

не-ЛПВП холестерина может рассматриваться как более сильный предиктор сердечно-сосудистых заболеваний, чем уровень ХС-ЛПНП (Liu et al., 2005; Pischon et al., 2005), особенно у пациентов, принимающих статины (Gotto et al., 2000). Особенно важно учитывать содержание не-ЛПВП холестерина в случае, когда уровень ХС-ЛПНП низкий или умеренный. Отмечается снижение содержания не-ЛПВП холестерина в процессе приема препаратов и через 3, 6

месяцев в 2а группе составило: 43% ($p < 0,001$), 46% ($p < 0,001$); в 2б — 24% ($p < 0,001$), 29,5% ($p < 0,001$). В данном исследовании практически кривые показателей ХС-ЛПНП и не-ЛПВП холестерина практически идентичны.

Немалую роль в развитии атеросклеротического процесса играет соотношение компонентов общего холестерина (ОХС) и ЛПВП (липопротеинов высокой плотности). Для того чтобы это соотношение было более наглядным, используют ориентировочный показатель - индекс атерогенности, чаще его называют коэффициент атерогенности (КА).

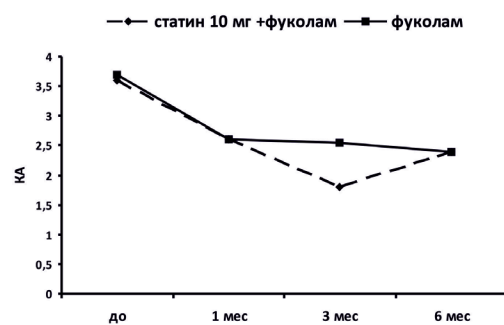


Рис. 7.14. Динамика изменений в содержании КА в сыворотке крови после лечения (1 месяц) и последующего профилактического применения препаратов (3 и 6 месяцев)

Исследования показали, что при приеме препаратов в группе 2а отмечалось значительное снижение КА до 3 месяца, но к 6 месяцу уровень его приблизился к норме, в группе 2б происходило постепенное динамичное снижение КА до 6 месяца (рис. 7.14). Коэффициент атерогенности является ос-

новным критерием, позволяющим следить за эффективностью лечения гиперхолестеринемии. Учитывая, что у пациентов данных групп уровень ХС-ЛПВП был в пределах нормы, снижение КА можно объяснить снижением концентрации общего ХС.

Сравнение уровня атерогенных липидов было также оценено по содержанию апопротеина В (апо В) — белкового компонента, присутствующего в ЛПНП - веществах циркулирующих в крови, осуществляющих транспорт холестерина. Определение апо В позволяет оценить степень риска развития ИБС у пациентов. Этот тест полезен для выявления остаточного риска у пациентов, которые уже принимают липидснижающую терапию и отреагировали уже снижением ХС-ЛПНП. Сохранение высоких значений апо В на фоне терапии служит поводом для некоторой ее оптимизации. Контуры кривых показателей апоВ обеих групп идентичны кривым показателям ХС-ЛПНП (рис. 7.15).

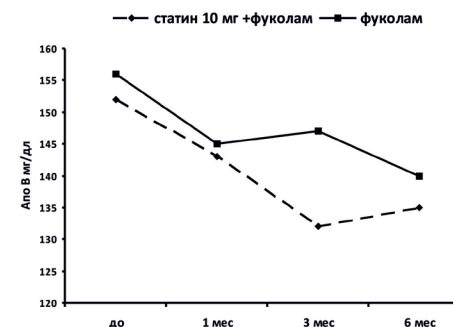


Рис. 7.15. Динамика изменений в содержании апо В в сыворотке крови после лечения (1 месяц) и последующего профилактического применения препаратов (3 и 6 месяцев)

Увеличение отношения апо В к апо А (более 1) служит одним из показателей атерогенного сдвига. Отношение апо В/апо А в сыворотке крови после 1 месяца лечения была различной: снижался риск развития ИБС в 2а

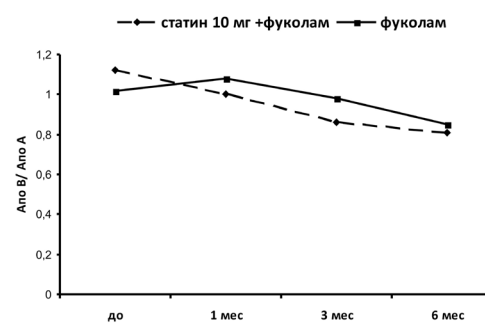


Рис. 7.16. Динамика изменений в содержании апо В/апо А в сыворотке крови после лечения (1 месяц) и последующего профилактического применения препаратов (3 и 6 месяцев)

группе, в то время как в 2б группе он оставался повышенным. При дальнейшем приеме препаратов отмечалось достоверное снижение соотношение апо В/апо А в сыворотке крови пациентов и к 6 месяцу составило для группы 2а — 26% ($p < 0,001$), группы 2б — 17% (рис. 7.16).

Существенно коррелирует с сердечно-сосудистой заболеваемостью и такой показатель, как липопротеин(а) — ЛП(а), который указывает на высокий риск как атерогенных процессов, так

и протромботических реакций. В отличие от ЛПНП, его уровень не зависит от уровня глюкозы в крови, наличия инсулинрезистентности и других факторов. Результаты, полученные в ходе исследования, показали снижение количества ЛП(а) в сыворотке крови в обеих группах, но при приеме системы статинов 10 мг+«Фуколам» оно было более выражено.

На рисунке 7.17 показана динамика снижения количества ЛП(а), положительный эффект отмечен как в группе 2а, так и 2б, причем при приеме

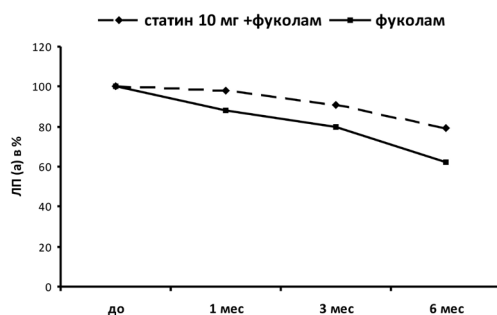


Рис. 7.17. Динамика изменений в содержании ЛП(а) в сыворотке крови после лечения (1 месяц) и последующего профилактического применения препаратов (3 и 6 месяцев)

статинов 10 мг+БАД «Фуколам» снижение его уровня более выражено. Концентрация ЛП(а) в сыворотке крови пациентов снижалась, но не пришла к норме. К 6 месяцу снижение ЛП(а) составило в группе 2а — 46,79%, в группе 2б — 30,19%. Считают, что ЛП(а) генетически детерминирована, и в настоящее время не существует лекарственных средств, снижающих ее, поэтому основная стратегия лечения пациентов с повышенной концентрацией

ЛП(а) – устранение всех прочих факторов риска ИБС (высокая концентрация ЛПНП, курение, избыточная масса тела, артериальная гипертензия).

Таким образом, гиполипидемическое действие «Фуколама» заключается в снижении общего ХС, ХС-ЛПНП, КА в уменьшении синтеза основного белка в составе атерогенных ЛПНП - апоВ. При этом выраженность гиполипидемического эффекта находится в прямой зависимости от степени исходной гиперлипидемии. Полученные данные позволяют говорить об эффективности «Фуколама» у больных ИБС со стабильной стенокардией напряжения II–III ФК. Наибольший гиполипидемический эффект достигается при комплексном применении фуколам с БТ, включающей аторвастатин 10 мг. Поэтому при лечении дислипидемий можно рекомендовать не повышать концентрацию статинов, учитывая нежелательные побочные их эффекты и высокую стоимость, а использовать в качестве дополнительного гиполипидемического средства фуколам.

Исходя из результатов клинического исследования БАД «Фуколам» может быть рекомендована для широкого использования в качестве профилактического и дополнительного средства к базисной терапии при различных формах ИБС, а, учитывая ранее полученные данные о

гепатопротекторной, антикоагулянтной, иммуномодулирующей активности фуколама, это позволит улучшить эффективность проводимых лечебных и профилактических мероприятий.

Динамика изменений нейтральных липидов в плазме крови после лечения через 3 и 6 месяцев с применением аторвастатина (10 мг) с «Фуколамом» (статины 10 мг+фуколам) или «Фуколама»

На рисунке 7.18 показано, что сразу после лечения отмечалось более эффективное снижение ТГ при БТ+фуколам (на 11%). Далее, через 3 мес величина

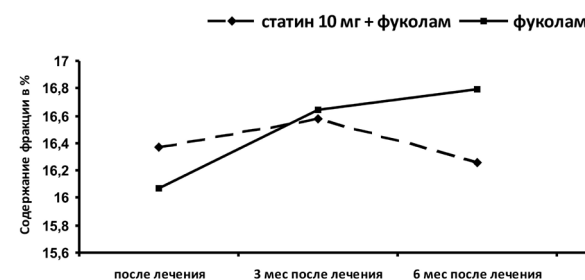


Рис. 7.18. Динамика изменений в содержании триглицеридов (ТГ) в плазме крови после лечения и последующего профилактического применения препаратов

ТГ в обеих группах была, в среднем одинаковой, в пределах 16,58–16,65%. Через 6 мес количество ТГ при лечении «Фуколамом» незначительно повысилось в пределах 3% (16,25% и 16,79%). Кроме того, эти величины достоверно не отличались от контрольного значения (16,00±0,58%).

Динамика изменений количества свободных жирных кислот и эфиров жирных кислот была практически одинаковой при обеих схемах терапии и не имела статистически достоверных отличий от контрольных показателей как до лечения, так и после него.

При исследовании динамики величины неэтерифицированного холестерина (ХС) в плазме крови в течение 6 мес после лечения следует отметить большее снижение этой фракции при приеме системы статинов+фуколам (рис. 7.19).

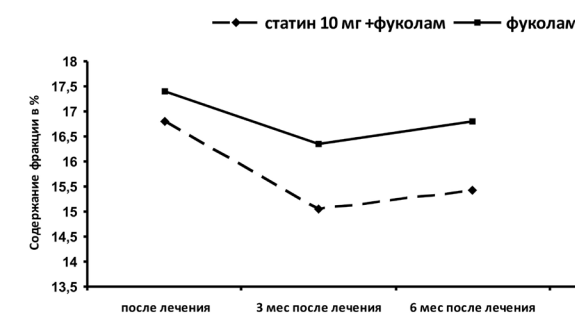


Рис. 7.19. Динамика изменений в содержании холестерина (ХС) в плазме крови после лечения и последующего профилактического применения препаратов

Величина ХС снизилась с 16,80±0,43% после лечения до 15,05±0,23% через 3 мес и до 15,43±0,39% через 6 мес. При приеме «Фуколама» величина ХС составляла 17,41±0,45% после лечения, через 3 мес – 16,36±0,56% и через 6 мес – 16,81%. То есть,

при использовании схемы статин+фуколам произошло снижение ХС на 19% через 3 мес и на 8% через 6 мес после лечения, тогда как при приеме «Фуколама» снижение ХС составляло через 3 и 6 мес в среднем на 6%.

При сравнении полученных значений ХС через 3 и 6 мес с контрольными величинами следует отметить, что лечение с применением статина сопровождалось стойким удерживанием величины неэтерифицированного холестерина (ХС) в плазме крови ниже контроля на 13-15%. При применении лечения БТ+фуколам значения ХС после лечения были в пределах контрольных величин, которые поддерживались в течение 6 мес применения фуколама.

При исследовании динамики величины эфиров холестерина (ЭХС) в плазме крови следует отметить, что через 3 мес эта величина была одинаковой как при приеме системы статин+фуколам, так и фуколама ($26,84 \pm 0,45\%$ и $26,92 \pm 0,56\%$, соответственно) (рис. 7.20).

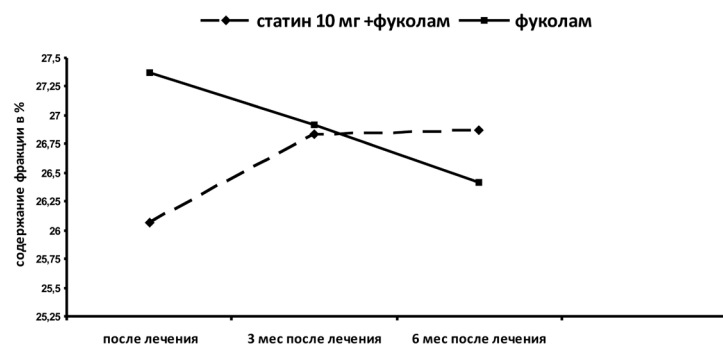


Рис. 7.20. Динамика изменений в содержании эфиров холестерина (ЭХС) в плазме крови после лечения и последующего профилактического применения препаратов

Через 6 мес величины ЭХС сохранились на уровне зафиксированных через 3 мес приема препаратов. Таким образом, применение статина+фуколам и «Фуколама» после лечения в течение 6 мес сопровождалось сохранением показателей нейтральных липидов на уровне величин, которых имели место после лечения. Применение статина стойко удерживало величину ХС и ЭХС ниже контрольного уровня на 10-15%.

Динамика изменений фосфолипидного состава плазмы крови после лечения в течение 6 мес с применением аторвастатина (10 мг) с фуколамом (статин 10 мг+фуколам) или фуколама

Изучение динамики изменений фосфолипидных фракций в плазме крови после лечения в течение 6 мес показало, что прием больными

системы статин 10 мг + фуколам или только фуколам сохраняет исследованные величины на уровне таковых, которые были зарегистрированы при выписке из стационара. Так, если после лечения БТ+статин 10 мг + фуколам в плазме крови пациентов количество фосфатидилхолина (ФХ) было на уровне $45,11 \pm 0,71\%$, то через 3 и 6 мес его величина была в пределах $44,33$ — $44,69\%$ (рис. 7.21). При приеме фуколама величина ФХ как после лечения, так и через 3 и 6 мес была в пределах 44%.

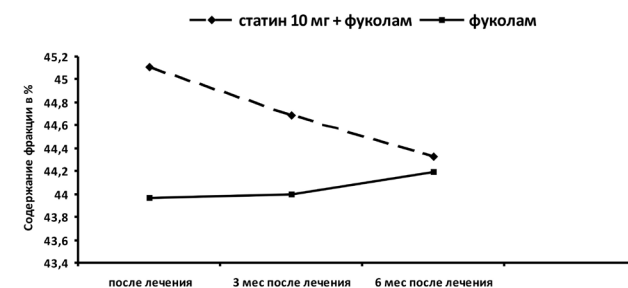


Рис. 7.21. Динамика изменений в содержании фосфатидилхолина (ФХ) в плазме крови после лечения и последующего профилактического применения препаратов

Изучение динамики величины лизофосфатидилхолина (ЛФХ) (рис. 7.22) в плазме крови пациентов показало, что при приеме системы статин 10 мг + фуколам происходило сохранение этой фракции через 3 и 6 мес ($11,00 \pm 0,18\%$ и $11,21 \pm 0,17\%$, соответственно) на уровне, зафиксированной после выписки ($10,94 \pm 0,32\%$).

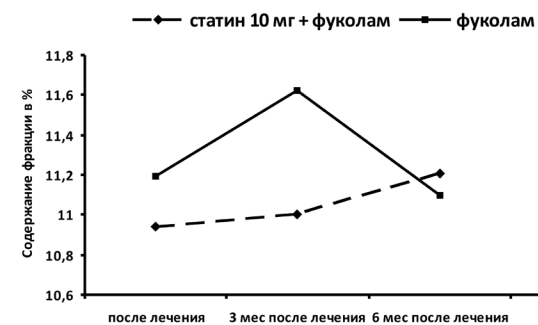


Рис. 7.22. Динамика изменений в содержании лизофосфатидилхолина (ЛФХ) в плазме крови после лечения и последующего профилактического применения препаратов

При приеме фуколама содержание ЛФХ в плазме крови через 3 и 6 мес ($11,62 \pm 0,42\%$ и $11,10 \pm 0,20\%$) также было на уровне величин после лечения ($11,19 \pm 0,35\%$).

Динамика изменений в содержании сфингомиелина (СМ) в плазме крови пациентов после лечения в течение 3 и 6 мес показала плавное колебание величины этой фракции как при приеме системы статин 10 мг + фуколам, так и фуколама (рис. 7.23).

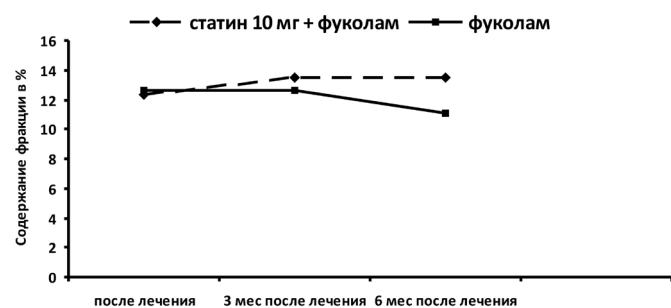


Рис. 7.23. Динамика изменений в содержании сфингомиелина (СМ) в плазме крови после лечения и последующего профилактического применения препаратов

Так, при приеме системы статин 10 мг + фуколам количество СМ составляло 3 и 6 мес практически одинаковую величину — $13,50 \pm 0,32\%$. При приеме фуколама количество СМ через 6 мес составляло $12,92 \pm 0,34\%$, что соответствовало таковому уровню после лечения ($12,67 \pm 0,33\%$) и соответствовали контрольным величинам.

Динамика изменений в содержании фосфатидилэтаноламина (ФЭ) относительно таковых величин после лечения при приеме системы статин 10 мг + фуколам и фуколама до 3 мес была практически одинаковой (в среднем, $8,50 \pm 0,20\%$).

Через 6 мес количество ФЭ у первых немного снизилось до $7,81 \pm 0,18\%$ (рис. 7.24). В то же время эти величины сохранялись на уровне таковых после лечения и соответствовали контрольным показателям.

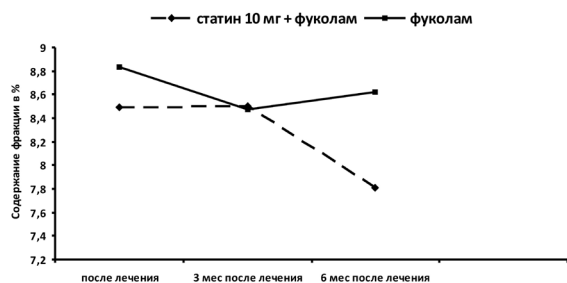


Рис. 7.24. Динамика изменений в содержании фосфатидилэтаноламина (ФЭ) в плазме крови после лечения и последующего профилактического применения препаратов

При исследовании динамики в содержании лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) в плазме крови па-

циентов, принимавших систему статин 10 мг + фуколам было замечено, что через 3 и 6 мес после лечения значения данной фракции были в пределах $5,90$ – $5,97\%$, что соответствовало контрольным значениям (рис. 7.25). При применении фуколама величина ЛФЭ в плазме крови оставалась на уровне таковой после лечения, то есть в пределах $6,10 \pm 0,26\%$.

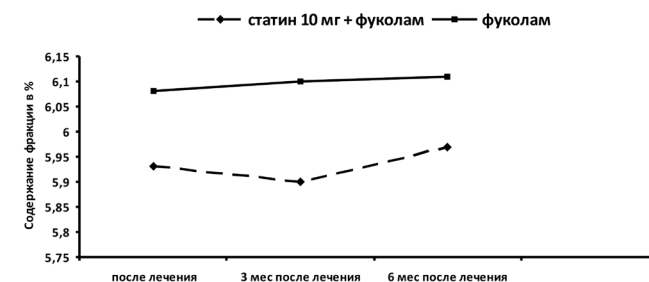


Рис. 7.25. Динамика изменений в содержании лизофосфатидилэтаноламина (ЛФЭ) в плазме крови после лечения и последующего профилактического применения препаратов

Величина фосфатидилсерина (ФС) в плазме крови пациентов обеих групп была практически идентичной как через 3 мес, так и через 6 мес и сохранялась на уровне таковой, зафиксированной после лечения (рис. 7.26).

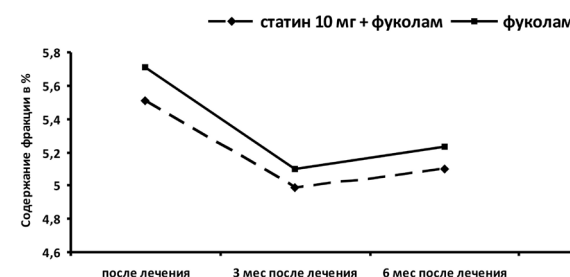


Рис. 7.26. Динамика изменений в содержании фосфатидилсерина (ФС) в плазме крови после лечения и последующего профилактического применения препаратов

При исследовании динамики изменений в содержании фосфатидилинозита (ФИ) в плазме крови пациентов через 3 мес после приема системы статин 10 мг + фуколам было отмечено снижение этого показателя с $6,14 \pm 0,22\%$ после лечения до $5,64 \pm 0,28\%$, а затем опять увеличение до $5,92 \pm 0,20\%$ через 6 мес (рис. 8.27). Однако эти колебания были недостоверны относительно контроля, а также относительно таковых после лечения.

При исследовании динамики изменений количества ФИ в плазме крови (рис. 26) при приеме фуколама отмечается его увеличение через 3 мес до

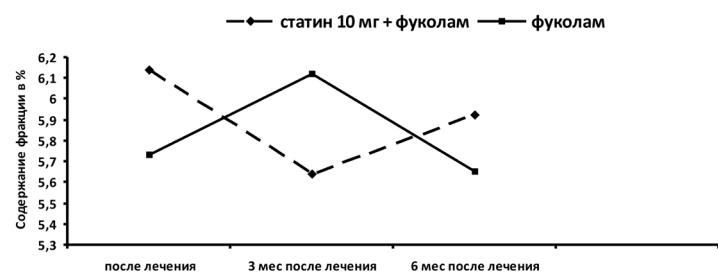


Рис. 7.27. Динамика изменений в содержании фосфатидилинозита (ФИ) в плазме крови после лечения и последующего профилактического применения препаратов

6,12±0,25% (5,73±0,09% после лечения), а затем снижение до 5,65±0,26% через 6 мес. Однако эти колебания были статистически не достоверны по сравнению как с контролем, так и с таковыми после лечения.

Динамика изменений количества дифосфатидилглицерина (ДФГ) в плазме крови пациентов практически совпадала как при приеме системы статин 10 мг + фуколам, так и при приеме фуколама (рис. 7.28).

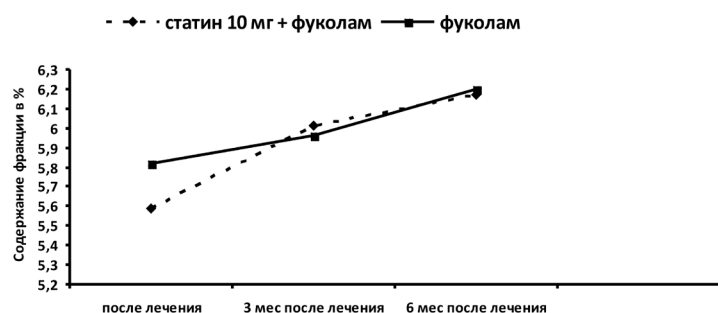


Рис. 7.28. Динамика изменений в содержании дифосфатидилглицерина (ДФГ) в плазме крови после лечения и последующего профилактического применения препаратов

Колебания этого показателя в плазме крови при приеме системы статин 10 мг + фуколам и фуколам были идентичными. Проявлялась тенденция к росту этой фракции. Если при приеме статин 10 мг + фуколам через 3 мес эта величина составляла 6,01±0,15%, а через 6 мес – 6,17±0,15%, то при приеме фуколама через 3 мес количество ДФГ в плазме крови составляло 5,96±0,09%, а через 6 мес – 6,20±0,36%. Это позитивный фактор, так как эта фракция необходима для функционирования ферментов дыхательной цепи митохондрий, что важно для энергообеспечения реакций синтеза при восстановлении структуры мембран.

В других исследованиях авторы настоящей главы (Майстровский и др.,

2010) исследовали влияние фукоидана из *F. evanescens* на показатели липидного обмена у 60 пациентов с окклюзионными заболеваниями сосудов и ишемией нижних конечностей IIА – IIIА стадий по Фонтейну – Покровскому. Все пациенты были разделены на группы: пациенты 1 группы получали базовую инфузионную терапию, дезагреганты, спазмолитики. Пациенты 2 группы в дополнение к традиционной терапии получали фукоидана из *F. evanescens* в составе БАД «Фуколам» по 1 капсуле (500 мг) 2 раза в день в течение 21 дня. Группа контроля состояла из 30 здоровых доноров без очевидных факторов риска развития атеросклероза.

Согласно последним данным Совета Экспертов и Методических рекомендаций Всероссийского научного общества кардиологов, опубликованных в 2009 году, верхняя граница нормального уровня ОХС в сыворотке крови в российской популяции составляет 6,2 ммоль/л. Однако, с позиций профилактики атеросклероза и его осложнений, желательно, чтобы уровень ОХС в сыворотке крови не превышал 5,0 ммоль/л, ТГ – 1,7 ммоль/л, ЛПНП – 3,0 ммоль/л, а ЛПВП был в пределах 1,0–1,89 ммоль/л.

В нашем исследовании уровень общего холестерина в сыворотке крови пациентов варьировал от нормальных значений (<5,2 ммоль/л) до высоких (≥6,2 ммоль/л), средние значения в группах до начала исследования находились в пределах 5,2–6,0 ммоль/л (табл. 7.4).

Таблица 7.4

Показатели липидного обмена у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей

Показатель	Подгруппа ¹	M±σ	t-test
Холестерин, ммоль/л	1	5,2±0,8	
	2	5,1±0,6	P1-2=0,586
	Здоровые доноры	3,8±0,8	P4-5=0,87
ЛПВП, ммоль/л	1	1,2±0,3	
	2	1,2±0,3	P1-2=1,00
	Здоровые доноры	1,4±0,2	P4-5=0,134
ЛПНП, ммоль/л	1	3,3±0,8	
	2	3,4±0,7	P1-2=0,75
	Здоровые доноры	2,4 ±0,4	P3-4=0,337
ЛПОНП, ммоль/л	1	0,6±0,2	
	2	0,7±0,2	P1-2=0,10
	Здоровые доноры	0,6±0,1	

Индекс атерогенности	1	3,3±1,1	P1-2=0,464
	2	3,1±1,0	
	Здоровые доноры	2,4±0,2	
Триглицериды, ммоль/л	1	1,3±0,4	P1-2=0,49
	2	1,4±0,5	
	Здоровые доноры	0,9±0,2	

Примечание: 1- пациенты контрольной группы до лечения; 2- пациенты контрольной группы после лечения.

Как видно из табл. 7.4. неблагоприятное распределение ОХС между атерогенными и антиатерогенными фракциями липопротеидов у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей - накопление его в ЛПОНП и ЛПНП — приводило к увеличению индекса атерогенности, значимо отличавшегося от такового у здоровых доноров. Уровень триглицеридов находился в границах значений нормы, однако значимо отличался от средних значений в группе здоровых доноров. Наиболее высокие уровни ЛПНП определялись у пациентов с атеросклерозом сосудов нижних конечностей в сочетании с ишемической болезнью сердца (ИБС) I и II степени, гипертонической болезнью (ГБ) I и II степени при сопутствующей гиперхолестеринемии (6,0±0,6 ммоль/л).

По окончании традиционного базового лечения концентрация общего холестерина в сыворотке крови пациентов контрольной группы (5,1±0,6 ммоль/л) не изменялась по сравнению с исходными значениями (5,2±0,8 ммоль/л) (p=0,686). Аналогичная динамика была характерна и для показателей агрессивных липидных фракций — ЛПНП, ЛПОНП и триглицеридов, уровень которых оставался на прежнем уровне (табл. 7.4).

У пациентов, получавших БАД «Фуколам», наблюдалась отчетливая антиатерогенная динамика липидного обмена (рис. 7.29).

Так, концентрация общего холестерина значимо снижалась с 4,9±0,6 ммоль/л до 4,1±0,5 ммоль/л (p=0,00). Следует подчеркнуть, что гипохолестеринемическое действие фукоидана наблюдалось в случаях как исходно высоких (с 5,8±0,6 ммоль/л до 5,1±0,5 ммоль/л, p=0,000, n=12), так и исходно нормальных значений показателя ОХС (с 4,1±0,4 ммоль/л до 3,3±0,4 ммоль/л, p=0,009, n= 10). На фоне снижения уровня общего холестерина наблюдалась нормализация его распределения между фракциями липопротеидов: концентрация ЛПВП в сыворотке крови увеличивалась с 1,0±0,2 ммоль/л до 1,3±0,4 ммоль/л, значимо отличаясь от показателя до начала лечения (p=0,000), концентрация ЛПНП

– снижалась с 3,2±0,7 ммоль/л до 2,1±0,4 ммоль/л, (p=0,000), что приводило к снижению индекса атерогенности с 3,9±0,7 до 2,6±0,8, (p=0,001). Уровень триглицеридов снижался у пациентов как с исходно высокими показателями (с 2,4±0,4 ммоль/л до 1,6±0,6 ммоль/л, p=0,001, n=10), так и у пациентов с показателями, находящимися в границах средне-нормальных значений (рис. 7.29).

Выполненные нами исследования показали, что включение БАД «Фуколам» на основе фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* в схему консервативной терапии больных облитерирующим атеросклерозом

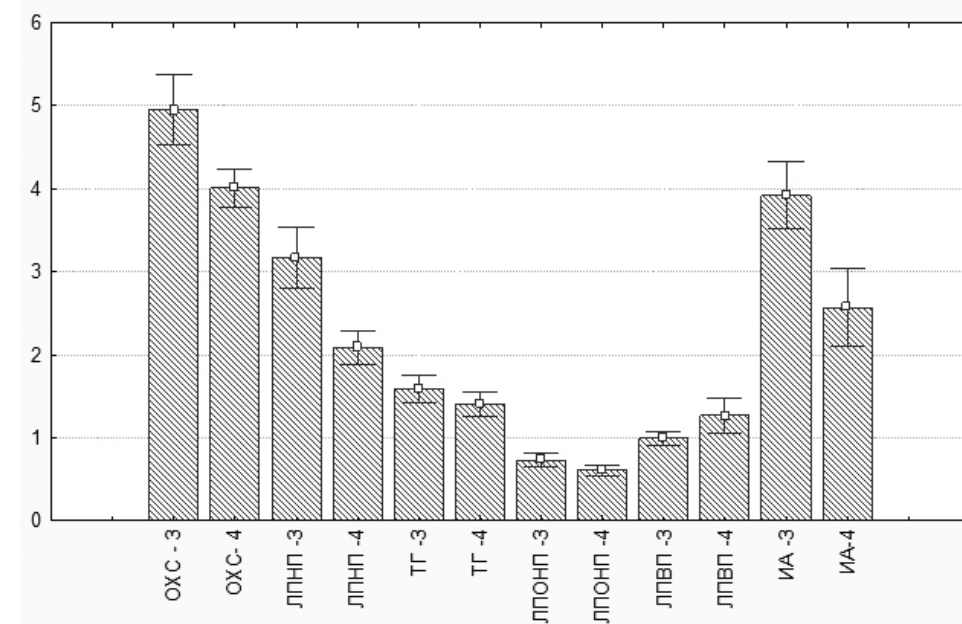


Рис. 7.29. Влияние «Фуколама» на показатели липидного обмена у пациентов с атеросклерозом сосудов нижних конечностей. По оси ординат — концентрация липидных фракций в сыворотке крови (ммоль/л); 3 — пациенты опытной группы до лечения; 4 — пациенты опытной группы после лечения

сосудов нижних конечностей приводит к нормализации распределения холестерина между фракциями липопротеидов и снижению коэффициента атерогенности. Как уже отмечалось, одним из ключевых моментов в атеросклеротическом воспалении является снижение рецепторного поглощения клетками ХС ЛПНП и, как следствие, накопление его в крови и тканях где они подвергаются модификации, включающей гликозилирование, ацетилирование и оксидацию липидов, деградацию апопротеина и другие химические изменения. Патогенетическое значение ЛПНП

определяется выраженными провоспалительными и проатерогенными свойствами — способностью к стимуляции синтеза молекул адгезии, хемокинов, факторов роста, пролиферации гладкомышечных клеток и их миграции из медиа в интиму, репликации и синтезу соединительной ткани. По мнению В.В. Тертова и др. (1994), изменение структуры ЛПНП происходит из-за снижения их содержания в составе сиаловых кислот, являющихся полифункциональными соединениями с сильными кислотными свойствами. Как правило, в норме в свободном виде сиаловые кислоты не встречаются, а входят в состав различных углеводсодержащих веществ (гликопротеины, гликолипиды, олигосахариды). Занимая в их молекулах концевое положение, сиаловые кислоты оказывают значительное влияние на физико-химические свойства и биологическую активность этих соединений. В. Li et al. (2008) полагают, что фукоиданы, действуя подобно сиаловым кислотам, увеличивают отрицательный заряд клеточной поверхности, способствуя связыванию холестерина и желчных кислот, ответственных за транспорт жиров из кишечника в кровь (Nap L-K. et al., 2004). В свою очередь полисахариды, связываясь в просвете кишечника с желчными кислотами, способны прерывать рециркуляцию богатого холестерином пула желчных кислот и усиливать их экскрецию с фекалиями (Пискун и др., 1998; Gallaher . et al. 2002). В результате в печеночных клетках развивается дефицит холестерина, для компенсации которого увеличивается количество мембранных рецепторов к ЛПНП, обеспечивающих дополнительный клиренс ХС ЛПНП из плазмы, что, в свою очередь, ведет к снижению уровня ХС в плазме крови.

Гипохолестеринемический эффект фукоидана может быть также обусловлен способностью полисахаридов слабее связывать гидрофильные желчные кислоты, способствуя увеличению в плазме относительного содержания гидрофобных желчных кислот, которые сильнее, чем гидрофильные кислоты, ингибируют активность холестерин-7-гидроксилазы в печени (Хотимченко и др., 2005.) Другое объяснение может состоять в продукции короткоцепочечных жирных кислот (пропионовой, уксусной и масляной) при бактериальной ферментации полисахаридов, также ингибирующих синтез холестерина в печени (Хотимченко и др., 2005; Sagawa, Kato, 2003).

Молекулярные механизмы изменения липидного метаболизма в настоящее время рассматриваются с учетом изменений функциональной активности макрофагов, трансформирующихся в пенные клетки и включающей, по меньшей мере, два механизма. Один из них обусловлен связыванием модифицированных липопротеинов рецепторами, доминирующими среди которых являются сквенджер-рецепторы, другой — с действием провоспалительных цитокинов (Душкин, 2006.) с участием

ядерных гормональных рецепторов: PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptors — ядерных рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом), LXR, RAR и др.) и транскрипционных факторов — ядерного каппа-В и AP-1 (Chawla et al., 2001). В этой связи в терапии атеросклероза патогенетически обоснованными являются фармакологические и иммунотерапевтические подходы, обеспечивающие блокирование рецепторов макрофагов и модуляцию продукции цитокинов и ингибирование транскрипционных процессов.

Установленные нами противовоспалительные и гиполипидемические свойства фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* (в составе БАД «Фуколам») могут быть обусловлены блокированием сквенджер-рецепторов, для которых сульфатированные полисахариды являются лигандами (Jin et al., 2009), а также установленной нами ранее способностью этого полисахарида снижать исходно высокий уровень провоспалительных цитокинов, продуцируемых макрофагами — TNF α , IL-8, IL-1, IL-6 (Запорожец, 2006) и ослаблять С-FOS или С-Jun транскрипционную активность, препятствуя связанной с активатором белка-1 (AT-1) транскрипционной деятельности (Jin et al., 2009).

Гиполипидемическое действие фукоиданов может быть связано и с влиянием на адипоциты - клетки, участвующие в жировом обмене. В целом, ожирение ассоциируется со степенью дифференцировки адипоцитов, накоплением внутриклеточных липидов и липолизом (Shi, Burn, 2004). В 2011 году появилось сообщение М.К. Park et al. об ингибирующем эффекте фукоидана на аккумуляцию липидов, опосредованным регуляцией уровня гормончувствительной липазы (HSL), которая является ограничивающим ферментом, обеспечивающим гидролиз ТГ жирных кислот. Накопление липидов под действием фукоидана снижалось на 16,5—52,2% при дозе фукоидана 100 мкг/мл и 200 мкг/мл соответственно. Одновременно в адипоцитах снижался уровень ТГ и увеличивался - HSL. Эти исследования свидетельствуют о способности фукоидана индуцировать липолиз в адипоцитах, усиливая синтез HSL.

Установленная в работе (Kim et al., 2009) способность фукоидана подавлять дифференцировку адипоцитов, опосредованную уменьшением экспрессии генов PPAR γ , p38MARKs, а также генов белка, связывающего жирные кислоты (AP2ацетил-КоА-карбоксилазы), является фактором, предотвращающим накопление эндогенного жира. Показано также (Yokota et al., 2009), что фукоидан стимулирует внутриклеточный транспорт липопротеинлипазы и уменьшает деградацию этого фермента в адипоцитах, что позволяет использовать его для ингибирования накопления жира. Действие фукоидана в этом случае связано с индукцией

экспрессии мРНК липопротеинлипазы, а также индукцией секреции аполипопротеина С-II - кофактора, ответственного за активацию липопротеинлипазы в капиллярах. Полученные результаты подтверждают и данные М.Я. Розкина (1991), показавших способность фукоиданов стимулировать липолиз путем активации фермента липопротеинлипазы.

Возможные механизмы гипогликемического эффекта фукоидана также могут быть связаны с замедлением всасывания глюкозы из кишечника в кровь, стимуляцией ферментов, ответственных за утилизацию глюкозы, а также стимуляцией высвобождения инсулина. Кроме того, липидопонижающий эффект фукоидана может обуславливать увеличение поглощения глюкозы периферическими тканями.

Таким образом, результаты проведенных нами исследований показывают, что фукоидан, полученный из бурой водоросли *F. evanescens*, не только является модулятором функций врожденного и адаптивного иммунитета (Запорожец, 2006), но и обладает уникальной многокомпонентной биологической активностью, обусловленной его структурными особенностями. Сочетание противовоспалительных и иммуномодулирующих свойств с антикоагулянтной активностью, а также гиполипидемические и антиоксидантные свойства делают перспективным его использование при атеросклерозе.

В современной мировой практике известны биопрепараты, по общему действию аналогичные фукоидану, однако они ограниченно представлены на отечественном рынке и обладают высокой стоимостью. В то же время уникальность химических структур, наличие сырьевой базы в Дальневосточном регионе, экологически чистые и экономичные технологии производства создают предпосылки для более широкого использования в клинической практике фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens*.

Глава 8. Сульфатированные полисахариды бурых водорослей – агонисты функций врожденного иммунитета

Согласно современным представлениям, иммунная система у 2% многоклеточных организмов, в том числе и у человека, представлена двумя взаимосвязанными элементами — врожденным и адаптивным иммунитетом, в основе функционирования которых лежат разные механизмы действия (Семенов, Зверев, 2007; Хаитов, 2009). Врожденный иммунитет является филогенетически более древней линией защиты организма от патогенов (Семенов, Зверев, 2007) и функционирует, опираясь на воспаление и фагоцитоз, тогда как адаптивный иммунитет использует антитела и иммунные лимфоциты (Абелев, 1998).

К системе врожденного иммунитета относят кожу, слизистые и гуморальные факторы — комплемент, лизоцим, растворимые рецепторы для патогенов и многочисленные клеточные элементы — макрофаги (Мф), дендритные клетки (ДК), моноциты, тучные клетки, нейтрофилы (Нф), эозинофилы, базофилы, натуральные киллеры (НК-клетки), Т- и В-клетки, Т_h1-лимфоциты (Ковальчук и др., 2005; Семенов, Зверев, 2007; Гузилова, Москалева, 2009). Механизмы действия врожденного иммунитета обеспечивают быструю элиминацию патогенов и предотвращение развития инфекционного процесса на ранних этапах, когда механизмы адаптивного иммунитета еще отсутствуют (Ковальчук и др., 2005).

Клетки врожденной иммунной системы не создают клонов, не подвергаются негативной и позитивной селекции и представляют собой готовые эффекторные элементы. Их действие проявляется в реакциях фагоцитоза, распознавании, переработке информации и презентации антигенных пептидов, необходимых для развития адаптивного иммунного ответа.

Врожденный иммунитет распознает консервативные, присущие только микроорганизмам, и отсутствующие у позвоночных, молекулярные структуры, обозначаемые в современной литературе термином патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMPs — *pathogen associated molecular patterns*), которые распознаются специальными образ распознающими рецепторами (*pattern recognition receptors* — PRR). Все PAMPs, несмотря на химические различия, имеют общие свойства (Beutler, 2004; Takeda, 2005a), которые необходимы для выживания и/или патогенности микроорганизмов и являются инвариантными структурами, присущими всему классу патогенов (Семенов, 2007; Pasare, Medzhitov, 2004; Merrell, Falkov, 2004; Takeda, 2005a).

Активация врожденного иммунитета сопровождается опсониза-

цией микроорганизмов, активацией системы комплемента и системы коагуляции, фагоцитозом, секрецией провоспалительных цитокинов, усилением апоптоза, хемотаксисом Нф, моноцитов и Мф из кровяного русла в очаг поражения и развитием локальных сосудистых реакций в воспалительном очаге.

Эффекторная функция врожденного иммунитета неспецифична и реализуется за счет механической защиты от патогенов (кожа, слизистые), фагоцитоза (ДК, Мф, Нф, моноциты, эозинофилы), разрушения инфицированных клеток (комплемент, НК-клетки), секреции цитокинов, синтеза антибактериальных пептидов (дефензинов) и хемокинов (Семенов, Зверев, 2007, Ахматова, Киселевский 2008).

Большое число работ в настоящее время посвящено Toll-рецепторам (TLRs) — особому классу клеточных рецепторов, которые распознают консервативные структуры микроорганизмов, активируют клеточный иммунный ответ и играют ключевую роль во врожденном иммунитете (Чикилева и др, 2010; Medzhitov et al., 1997; Armant, Fenton, 2002; Hansson, Edfeldt, 2005; Kumagai et al., 2008; Randhawa, Hawn, 2008). В настоящее время семейство TLRs включает более 20 членов (Roach et al., 2005), но более полно охарактеризовано только 13 рецепторов (табл. 9.1), экспрессированных главным образом на клетках врожденного иммунитета (Мф, ДК, Нф, НК-клетки, моноциты, Т- и В-лимфоциты), а также на эпителиальных клетках кишечника, кератиноцитах, клетках микроглии, селезенки, легких, плаценты, эндотелия сосудов, фибробластах и кардиомиоцитах (Ахматова, Киселевский 2008; Семенов, Зверев 2007; Ковальчук и др. 2005).

TLRs мгновенно распознают «чужое», в качестве которого могут выступать не только патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, но и эндогенные продукты – белки теплового шока, мочевую кислоту, нуклеиновые кислоты, продукты апоптоза и некроза. После взаимодействия TLRs с лигандом, происходит передача сигнала внутрь клетки и последовательная активация дополнительных молекул: адапторных белков (MyD88, TRIF, TRAM, TIRAP), протеинкиназ (семейство IRAK-киназ) и транскрипционных факторов (NF-κB, STAT1), в результате чего изменяется экспрессия широкого спектра генов провоспалительных цитокинов и интерферониндуцибельных генов (Ахматова, Киселевский 2008; Семенов, Зверев 2007; Ковальчук и др. 2005; Kenneth et al., 2005).

TLRs состоят из двух доменов, и принадлежат к семейству трансмембранных рецепторов, характеризующихся внеклеточным NH₂-концом и внутриклеточным COOH-концом. Внеклеточный домен содержит варьирующее число лектиновых повторов (LRR — leucine rich repeats),

которые образуют подковообразную структуру (Takeda, Akira, 2005b; Ковальчук и др. 2005; Ахматова, Киселевский 2008). Предполагают, что эти повторы обеспечивают прямое взаимодействие с лигандами микроорганизмов или их нуклеиновыми кислотами, а также участвуют в демеризации TLR. Цитоплазматический участок TLR сходен по строению с цитоплазматическим доменом рецептора IL-1 и получил название TIR - домен (Toll/interleukin-1 receptor). Через него осуществляется взаимодействие между TLRs и цитоплазматическими адаптерными молекулами, осуществляющими трансдукцию и трансляцию сигнала с последовательной активацией киназ и транскрипционного ядерного фактора NF-κB (*nuclear factor-κB*) (Хаитов и др., 2002; Akira et al., 2001; Armant, Fenton, 2002). Активация транскрипционного ядерного фактора NF-κB с экспрессией различных цитокинов и костимулирующих молекул является решающим фактором для формирования адаптивного иммунного ответа (Medzhitov et al., 1997; Ковальчук и др. 2005; Ахматова, Киселевский 2008).

Альтернативные сигнальные NOD-рецепторы врожденного иммунитета — нуклеотидсвязывающий олигомеризующийся домен (*nucleotide-binding oligomerization domain*), локализуется внутриклеточно и распознают PAMPs независимо от участия TLR, активируя транскрипционный ядерный фактор NF-κB и усиливая продукцию IFN-γ (Hoebe et al., 2004; Ахматова, Киселевский 2008). NOD-рецепторы принимают участие в распознавании пептидогликанов внутриклеточных бактерий. NOD2 - распознают консервативные мурамилпептидные структуры клеточной стенки всех бактерий (Girardin et al., 2003; Inohara, Nunez, 2003), в то время как NOD1 - распознают диаминопимелиновую кислоту, присутствующую в клеточной стенке пептидогликана грамотрицательных бактерий. (Girardin et al., 2003). При связывании лиганда NOD-рецепторы образуют большие цитоплазматические комплексы — инфламмосомы, которые обеспечивают активацию провоспалительных цитокинов — IL-1β и IL-18. Инфламмосома представляет собой особый белковый комплекс в Мф и Нф, который приводит к запуску воспалительной реакции при контакте клетки с микроорганизмами и играет важную роль в системе врожденного иммунитета (Drenth, Vander Meer, 2006; Martinon et al., 2009).

Таблица 8.1

Характеристика Toll-like рецепторов

Рецептор	Экспрессия и локализация TLRs	Лиганды	Функция	Путь передачи
TLR-1	ДК, Мф, НК, моноциты, клетки селезенки. Расположены на поверхности клетки (ген локализован на 4p14 хромосоме).	Липопептиды бактерий.	В комплексе с TLR2 (TLR1/TLR2) участвуют в ответе на триацилированные липопротеины.	MyD88/Mal
TLR-2	Миелоидные ДК, Мф, моноциты. Расположены на поверхности клетки (4q 31/3-32 хромосома).	Пептидогликан, гликолипиды, липопептиды, липопротеины, ЛПС, липотейхвые кислоты клеточной стенки бактерий. Гемагглютинин вируса кори, гликопротеины вирусной оболочки. Зимозан (грибы). Гликоинозитолфосфолипиды, гликофосфатидилнозитол (простейшие).	Играют ключевую роль в распознавании продуктов грамположительных бактерий, вирусов, микобактерий, дрожжей. Участвуют в распознавании белка теплового шока.	MyD88/Mal
TLR-3	ДК, НК, В-лимфоциты. Расположены внутриклеточно (4q35 хромосома).	ssRNA вирусов.	Распознают молекулярные структуры, ассоциированные с вирусной инфекцией.	TRIF
TLR-4	ДК, Мф, Нф, эпителиальные клетки, Т- и В-лимфоциты. Расположены на поверхности клетки (9q32-33 хромосома).	ЛПС бактерий. F белок и гликопротеины вирусной оболочки (респираторно-сентициальный вирус).	Распознавание ЛПС. Участвуют в распознавании белка теплового шока, фибриногена, фрагментов гепарансульфата и гиалуроновой кислоты.	MyD88/Mal/TRIF/TRAM

TLR-5	ДК, моноциты, Т-лимфоциты, НК, эпителиальные клетки. Расположены на поверхности клетки (1q33 хромосома).	Флагеллин.	Распознавание флагелина Гр (+) и Гр (-) бактерий. Активация TLR5 на CD4+ клетках приводит к повышению экспрессии транскрипционного фактора - Foxp3 в Treg-клетках и усилению их супрессорной активности.	MyD88
TLR-6	В-лимфоциты, моноциты, НК, клетки селезенки. Расположены на поверхности клетки (4p хромосома).	Липопептиды бактерий. Зимозан (грибы).	В комплексе с TLR2 (TLR6/TLR2), участвует в распознавании пептидогликанов и зимозана.	MyD88/Mal
TLR-7	Плазмцитойдные ДК, В-лимфоциты, клетки селезенки, плаценты. Расположены внутриклеточно (Xp22.3 хромосома).	sRNA вирусов, imidizoquinoline (синтетический препарат с антивирусной активностью).	Противовирусная защита (продукция IFN I типа).	MyD88
TLR-8	Моноциты. Расположены внутриклеточно (Xp22 хромосома).	sRNA вирусов, imidizoquinoline.	Противовирусная защита (продукция IFN I типа).	MyD88
TLR-9	Плазмцитойдные ДК, МФ, НК, клетки микроглии. Расположены внутриклеточно (3p21.3 хромосома).	CpG мотив бактериальной ДНК, гликопротеины вирусной.	Участвует в распознавании неметилированных CpG-мотивов бактерий.	MyD88

TLR-10	Моноциты, В-лимфоциты, плазмоцитоподобные ДК, Мф. Расположены на поверхности клетки (4p14 хромосома).	—	Образует гетеродимерный комплекс с TLR1 и TLR2 и участвует в иммунном ответе как корецептор.	MyD88
TLR-11	Моноциты, Мф, эпителий мочевого пузыря, селезенка, В-лимфоциты, плазмоцитоподобные ДК. Расположены на поверхности клетки (4p14 хромосома).	Профелин уропатогенных бактерий. Профилин подобный белок <i>Toxoplasma gondii</i> .	Предположительно участвует в иммунном ответе как корецептор.	MyD88
TLR-12 TLR-13	Плазмоцитоподобные ДК, Мф, моноциты, В-лимфоциты. Расположены на поверхности клетки (4p14 хромосома).	—	Предположительно участвуют в иммунном ответе как корецепторы.	—
TLR-14– TLR-23	—	—	—	—

В последние годы накапливается все больше сведений о патологических процессах, связанных с Toll-подобными рецепторами (табл. 8.1). Широкий спектр лигандов, а также экспрессия TLRs на большинстве клеток организма способствуют их вовлечению в патогенез многих заболеваний. Дефекты в системе TLRs (нарушения распознавания лигандов, экспрессии TLR, трансдукции сигнала, выработки эффекторных молекул, а также полиморфизм генов TLR) могут приводить к развитию тяжелых инфекционных заболеваний (сепсис, менингит), аутоиммунных заболеваний, атеросклероза, аллергопатологии и др. Выявленные дефекты молекул, участвующих в трансдукции сигнала от TLR, лежат в основе повышенной восприимчивости к инфекциям, как, например, у больных с дефектом гена, кодирующего IRAK4-киназу (Хорева и др., 2008; Варивода 2008).

Активация синтеза и секреции провоспалительных цитокинов (IL-1, 2, 6, 8, 12 TNF- α , гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий

фактор — GM-CSF) приводит к развитию воспалительной реакции с подключением всех имеющихся систем защиты от патогенов. На клеточном уровне эффект реализуется в трех направлениях: а) происходит активация самих фагоцитов, усиливается их эффекторный потенциал (фагоцитоз, киллинг, продукция активных форм кислорода); б) уже имеющиеся антигенспецифические клетки адаптивного иммунитета переходят в активированное состояние и усиливают свои эффекторные функции (зрелые В-лимфоциты увеличивают продукцию иммуноглобулинов и становятся более чувствительными к антигенной стимуляции, а Т-эффекторы наращивают киллерные функции; в) происходит активация (прайминг) наивных лимфоцитов и подготовка их к началу адаптивного иммунного ответа (Takeda, Akira, 2005b).

Так как одной из главных функций врожденного иммунитета является распознавание и элиминация из организма чужеродных веществ антигенной природы, является очевидным, что одним из ведущих направлений в применении иммуномодуляторов является стимуляция антиинфекционного иммунитета.

Особую актуальность стимуляция антиинфекционного иммунитета приобрела в настоящее время, когда характерной чертой инфекционной патологии стал значительный рост хронических инфекционно-воспалительных заболеваний самой разнообразной этиологии и различной локализации, которые, как правило, вызываются слабо патогенными оппортунистическими микроорганизмами с атипичными биологическими свойствами и выраженной резистентностью к широкому спектру антибактериальных препаратов. Справиться с такими заболеваниями у лиц с пониженным антиинфекционным иммунитетом только средствами химиотерапии (антибактериальные, противовирусные и антигрибковые препараты) сложно, особенно при вяло текущих, рецидивирующих, процессах. В связи с этим в комплексном лечении таких пациентов необходимо применение иммуотропных препаратов, к которым относятся и сульфатированные полисахариды, являющиеся агонистами функций врожденного иммунитета. Повышенный интерес к этим соединениям обусловлен широким спектром их биологической активности, а также отсутствием токсичности (Запорожец, 2006; Chung 2010; Kim 2010; Jiang et al 2010). Иммуномодулирующей активности биополимеров из морских гидробионтов посвящено множество работ, в которых установлено, что основной мишенью для них являются клетки-эффекторы врожденного иммунитета (Запорожец, 2006; Запорожец, Беседнова, 2007; Макаренко и др., 2009, 2010; Cumashi 2007; Na, 2010; Hwang, 2010; Gideon, Ren

Взаимодействие фукоиданов из бурых водорослей с TLRs на эукариотических клетках

Известно, что Toll-подобные рецепторы, экспрессированные на клетках врожденного иммунитета в виде гомо- и гетеродимеров, не только выполняют функцию сенсоров PAMPs микроорганизмов, но и способствуют инициации иммунного ответа на эндогенные лиганды (фибриноген, гиалуроновая кислоты, домен А фибронектина, гепарансульфатные фрагменты, синтетические и природные иммуномодуляторы (Ковальчук и др., 2005; Семенов, Зверев, 2007; Ахматова, Киселевский, 2008). Именно гетеродимеризация TLRs ведет не только к расширению спектра распознаваемых лиганд, но и к изменению их функций.

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

Целью наших исследований являлось изучение взаимодействия TLRs с различными по химической структуре фукоиданами из бурых водорослей — *F. evanescens*, *L. japonica* и *L. cichorioides* in vitro. В экспериментах были использованы перевиваемые клеточные линии эмбрионального почечного эпителия человека (HEK293-null, h-TLR2/CD14, -hTLR4/CD14-MD2, -hTLR5, h-TLR2/6), в геном которых генно-инженерным методом введены гены различных TLRs человека, репортерный ген фермента β -галактозидазы под контролем NF-kB зависимого промотера.

Для подтверждения специфичности взаимодействия фукоиданов с TLRs в качестве отрицательного контроля использовали клетки HEK 293-null, не экспрессирующие TLR, но содержащие в своем геноме репортерный ген β -галактозидазы. В качестве положительного контроля, подтверждающего функциональность TLRs, использовали соответствующие лиганды: липополисахарид *Escherichia coli* — для TLR4, синтетический липопептид - для TLR2 и гетеродимера TLR2/TLR6 и флагеллин — для TLR5 и TNF- α (10 нг/мл) для HEK293-null, который, взаимодействуя с собственным рецептором на поверхности клеток, способен активировать NF-kB, иницируя экспрессию гена β -галактозидазы.

Уровень экспрессии β -галактозидазы измеряли колориметрически через 72 часа после добавления фукоиданов, по скорости расщепления добавляемого неокрашенного субстрата орто-нитрофенил- β -галактопиранозид в окрашенный продукт — орто-нитрофенол, соответствующей оптической плотности \approx 1-2 оптических единиц — ОЕ (время инкубации 20 мин., при 37°C). Данный метод позволяет определить взаимодействие лиганда с соответствующим TLR по характерной цветовой окраске, возникающей при расщеплении субстрата под

действием экспрессирующегося фермента β -галактозидазы. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре iEMS Reader MF (Thermolabsystems, США) при длине волны 414 нм.

Токсическое действие фукоиданов, которое может являться причиной неспецифической активации NF-kB и повышения уровня экспрессии β -галактозидазы, определяли путем оценки процента выживаемости эукариотических клеток методом окраски метиленовым голубым. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре, используя фильтры 540 нм и 620 нм.

При исследовании специфического взаимодействия фукоиданов из бурых водорослей *L. japonica*, *L. cichorioides* и *F. evanescens* с TLRs человека установлено, что полисахариды в исследуемых концентрациях не оказывают влияния на клетки HEK293-null, не экспрессирующие TLRs ($0,696 \pm 0,045$), тогда как TNF- α , взаимодействующий с собственным рецептором (TNFR) на поверхности клеток, активирует транскрипционный фактор NF-kB, иницируя экспрессию гена β -галактозидазы ($2,195 \pm 0,055$).

Изучение специфического взаимодействия различных по химической структуре фукоиданов с TLRs, показало, что полисахариды с разной степенью эффективности вызывали активацию NF-kB, специфически связываясь с TLR2, TLR4 и гетеродимером TLR2/TLR6, но не оказывали влияния на экспрессию β -галактозидазы при взаимодействии с TLR5.

При взаимодействии полисахаридов с TLR-2 установлено (рис. 8.1), что

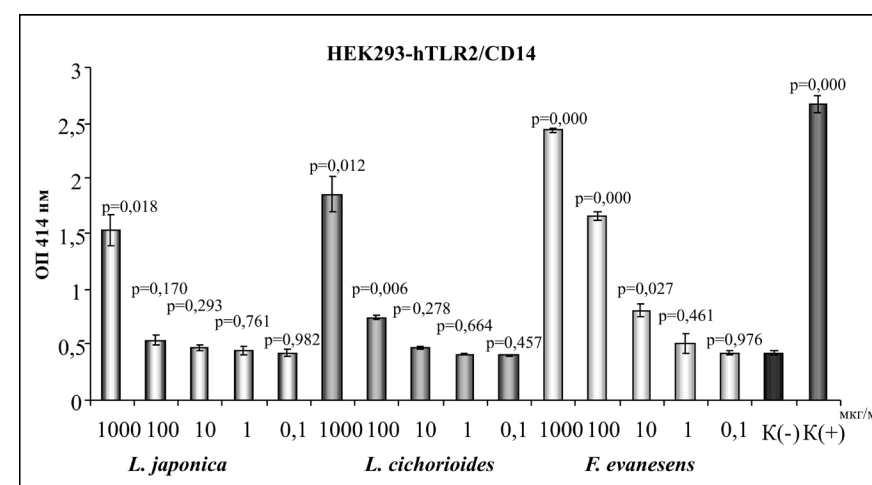


Рис. 8.1. Диаграмма активации транскрипционного ядерного фактора NF-kB при взаимодействии фукоиданов с HEK293-TLR2/CD14.

Примечание: K(-) — клетки линии HEK293, содержащие TLR2 и адаптерную молекулу CD14; K(+)) — липопептид

фукоидан из *L. japonica* вызывает активацию NF-κB в дозе 1000 мкг/мл (1,531±0,147), фукоидан из *L. cichorioides* — 1000 и 100 мкг/мл (1,852±0,161 и 0,744±0,011), а фукоидан из *F. evanescens* в концентрациях от 1000 до 10 мкг/мл (2,432±0,006; 1,661±0,038 и 0,804±0,059 соответственно) по сравнению с контролем (0,423±0,023). Активация NF-κB, при взаимодействии синтетического липопептида с TLR-2, подтверждающая функциональность рецептора составила 2,669±0,07 ОЕ.

Результаты взаимодействия сульфатированных полисахаридов с гетеродимером TLR2/TLR6 показали (рис. 8.2), что фукоидан из *F. evanescens* вызывает активацию NF-κB в концентрации — от 100 до 10 мкг/мл (2,282±0,06 и 1,746±0,049) по сравнению с контролем (1,15±0,11), а фукоиданы из *L. japonica* и *L. cichorioides* вызывают активацию транскрипционного ядерного фактора в концентрации 100 мкг/мл (1,723±0,035 и 1,951±0,057; соответственно). Действие синтетического липопептида, подтверждающего функциональность рецептора составило 2,679±0,156 ОЕ.

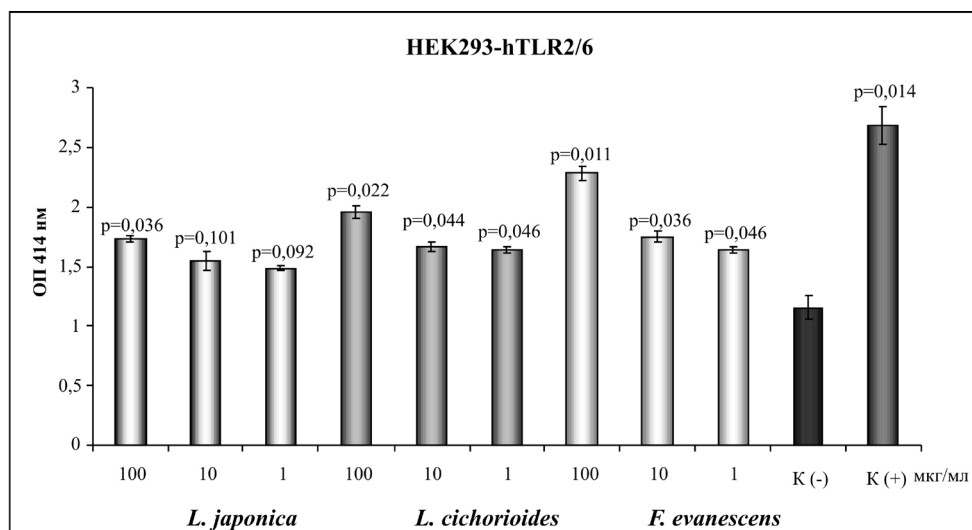


Рис. 8.2. Диаграмма активации транскрипционного ядерного фактора NF-κB при взаимодействии фукоиданов с HEK293-TLR2/TLR6.

Примечание: K(-) — клетки линии HEK293, содержащие гетеродимер TLR2/TLR6; K(+)
— липопептид (10 нг/мл)

При взаимодействии препаратов с TLR-4 установлено (рис. 9.3), что фукоидан из *L. japonica* активирует NF-κB в концентрациях 1000 и 100 мкг/мл (1,285±0,008 и 1,080±0,072), фукоидан из *L. cichorioides* — от 1000 до 10 мкг/мл (1,708±0,028; 1,621±0,037 и 0,912±0,007), а фукоидан из *F. evanescens* - от 1000 до 1,0 мкг/мл (1,784±0,041; 1,905±0,071; 1,407±0,029 и 0,890±0,013) по сравнению с контролем (0,641±0,024). Активация NF-

κB, при взаимодействии классического лиганда — ЛПС *E. coli* с TLR-4 составила 2,005±0,197 ОЕ.

Для подтверждения полученных результатов и исключения возможности неспецифической активации NF-κB было исследовано токсическое действие полисахаридов. В исследуемых концентрациях фукоиданы не оказывали такового на используемые в эксперименте культуры эукариотических клеток HEK293, что исключает возможность неспецифической активации NF-κB и повышения уровня экспрессии β-галактозидазы под действием фукоиданов.

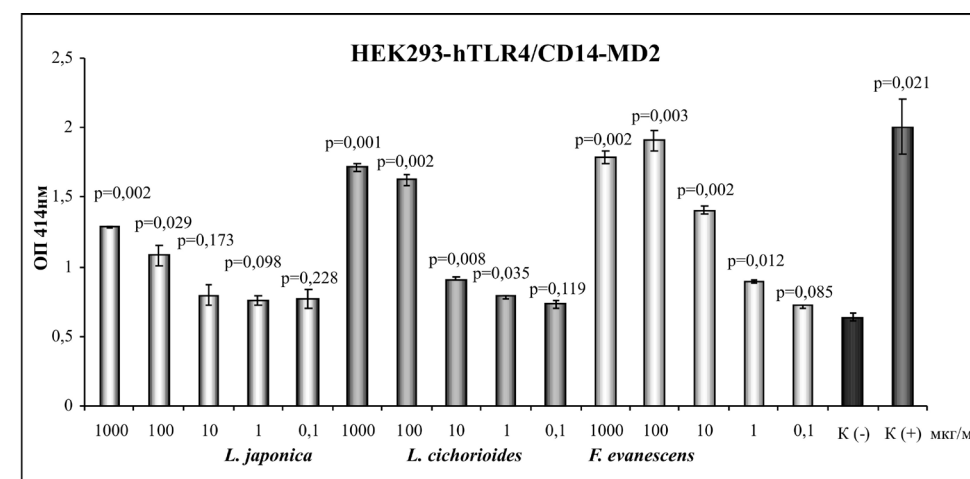


Рис. 8.3. Диаграмма активации транскрипционного ядерного фактора NF-κB при взаимодействии фукоиданов с HEK293-TLR4/CD14-MD2.

Примечание: K(-) — линия клеток HEK293, содержащая комплекс TLR4 с адаптерной молекулой CD14 и белком MD-2; K(+)
— ЛПС *E. coli*

Известно, что направление дифференцировки клеток-эффекторов врожденного иммунитета зависит от типа TLRs, участвующих в инициации передачи сигналов, и активации транскрипционного ядерного фактора NF-κB. Распознавание и связывание лиганд с TLRs индуцирует экспрессию различных защитных эффекторных механизмов врожденного иммунитета, в том числе секрецию цитокинов, хемокинов, экспрессию костимулирующих и МНС молекул I и II классов, необходимых для защиты клеток организма от проникновения чужеродных микроорганизмов и формирования адаптивного иммунного ответа (Ковальчук и др., 2005; Семенов, Зверев, 2007; Ахматова, Киселевский, 2008; Ward, 2010).

Согласно данным литературы, TLR2 для передачи сигналов использует MyD88 - зависимый путь, тогда как TLR4 использует не только адаптерную молекулу MyD88, но и адаптерную пару TRIF/TRAM, активи-

рующую IFN-регулирующие факторы. Специфическое взаимодействие фукоиданов с TLR2, TLR4 и гетродимером TLR2/TLR6, а также активация ядерного фактора NF- κ B свидетельствуют о дальнейшей транскрипции и индукции генов провоспалительных цитокинов и IFN-индуцибельных генов, способствующих активации иммунокомпетентных клеток, развитию адаптивного иммунного ответа по Th1 типу и созданию эффективной противоинфекционной защиты.

В свете современных представлений о врожденном иммунитете, полученные нами результаты позволяют утверждать, что различные по химической структуре фукоиданы из бурых водорослей *L. japonica*, *L. cichorioides* и *F. evanescens* в системе *in vitro* специфически взаимодействуют и являются лигандами для TLR2, TLR4 и TLR2/TLR6, вызывая активацию NF- κ B через MyD88 сигнальный путь или через адаптерную пару TRIF/TRAM. Фукоиданы из бурых водорослей, обладающие выраженной иммуностимулирующей активностью, в системе *ex vivo*, способны индуцировать генетически детерминированные биохимические процессы, которые инициируют активацию генов, ответственных за синтез цитокинов, а также способствовать формированию защиты против патогенов различных таксономических групп.

Влияние СПС на созревание дендритных клеток

Одним из ключевых элементов врожденного иммунитета являются дендритные клетки (ДК), способные распознавать патогенные микроорганизмы и опухолевые клетки, и участвовать в определении направленности и реализации эффекторных функций (Пащенко, Пинегин, 2006; Frantz et al., 2005; Hochrein, Keefe, 2008).

Отличительной чертой ДК от других антигенпрезентирующих клеток является их большая способность представлять антигены, и только они способны активировать и праймировать наивные Т-клетки. Именно ДК являются связующим звеном между врожденной и адаптивной иммунной системами. Распознавая ограниченное количество антигенов с помощью небольшого набора рецепторов врожденного иммунитета, они индуцируют адаптивный иммунный ответ, направленный на элиминацию практически любого антигена (Пащенко, Пинегин, 2006). Созревание ДК необходимо для формирования адаптивного иммунного ответа в отношении различных бактериальных и вирусных инфекций (Семенов, Зверев, 2007; Bowdish et al., 2005; Eckmann, 2005; Hochrein, O'Keefe, 2008). Активация ДК происходит после распознавания и взаимодействия экзогенных или эндогенных лигандов с образ-распознающими рецепторами и, прежде всего, с TLRs.

Созревание ДК является сложным процессом, который запускается в

условиях инфекции, разрушения тканей и воспаления и инициируется различными факторами. К ним относятся PAMPs микроорганизмов, TNF-подобные сигналы, провоспалительные цитокины и продукты некроза тканей, в норме отсутствующие в межклеточной среде (Семенов, Зверев, 2007; Janeway, Medzhitov, 2002; Mandal et al., 2007; Hochrein, O'Keefe, 2008).

Действие СПС на созревание и функциональную активность ДК до последнего времени оставалось мало изученным. В 2008 году появились работы корейских ученых о стимулирующем влиянии фукоидана из бурой водоросли *Fucus vesiculosus* на экспрессию маркерных генов, связанных с созреванием дендритных клеток (Kim, Joo, 2008).

J.O. Jin et al. (2009) установили, что в присутствии фукоидана - агониста SR-A, было снижено связывание антител к SR-A, экспрессированных на ДК периферической крови. Обработка ДК фукоиданом или антителами к SR-A заметно повышала экспрессию CD83, костимулирующих (CD86) и MHC II молекул. Обработанные фукоиданом ДК продуцировали TNF α , но не продуцировали IL-12p70. Фукоиданиндуцированное созревание ДК устранялось предварительной их инкубацией с TNF-нейтрализующими антителами. Секретия IFN γ и пролиферация Т-клеток повышались при совместном культивировании Т-клеток с ДК, созревание которых было вызвано фукоиданом. Таким образом, связывание SR-A приводит к индукции TNF α , который способствует созреванию ДК, и к повышению иммуностимулирующей способности Т-клеток.

В наших исследованиях установлено, что фукоиданы, выделенные из бурых водорослей *L. japonica* и *L. cichorioides*, являются индукторами созревания ДК, генерированных из костного мозга мышей линии СВА (Макаренкова и др., 2009). Для развития незрелых ДК в первый и на третий день к суспензии клеток костного мозга добавляли 80 нг/мл мышинового рекомбинантного GM-CSF и 20 нг/мл IL-4, который при культивировании ингибирует развитие гранулоцитов и макрофагов. На 6-е сутки инкубации среду меняли и для индукции созревания ДК вносили фукоиданы (50 мкг/мл) из *L. cichorioides* и *L. japonica*. В качестве положительного контроля использовали классический индуктор созревания ДК — TNF α (20 нг/мл). На 9-е сутки ДК отмывали от среды культивирования и использовали в экспериментах.

Изучение иммунофенотипа ДК, полученных из клеток костного мозга мышей, проводили на разных стадиях созревания. Экспрессию поверхностных маркеров ДК определяли при помощи FITC- и PE-меченных моноклональных антител против соответствующих антигенов: CD34, CD38, CD40, CD11c, CD86, CD83, MHC I и II классов, F4/80, TLR2, TLR4 и TLR9. Результаты учитывали на проточном цитометре (Becton Dickinson,

США). Данные анализировали после выделения логического гейта клеточной популяции в dot/plot распределении клеток по их линейному переднему (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. Анализировали минимум 10000 событий в гейте.

Установлено, что добавление сульфатированных полисахаридов в среду культивирования индуцировало созревание ДК (рис. 8.4), о чем свидетельствовала экспрессия маркера терминальной дифференцировки — CD83 на поверхности клеток, созревших под действием фукоиданов из *L. cichorioides* ($10,27 \pm 0,63\%$) и *L. japonica* ($16,13 \pm 1,45\%$), при отрицательном контроле, а также выраженное снижение экспрессии маркера незрелых ДК - CD34 под действием фукоиданов из *L. cichorioides* ($0,66 \pm 0,33\%$) и *L. japonica* ($0,24 \pm 0,14\%$) по сравнению с контролем ($23,2 \pm 0,82\%$).

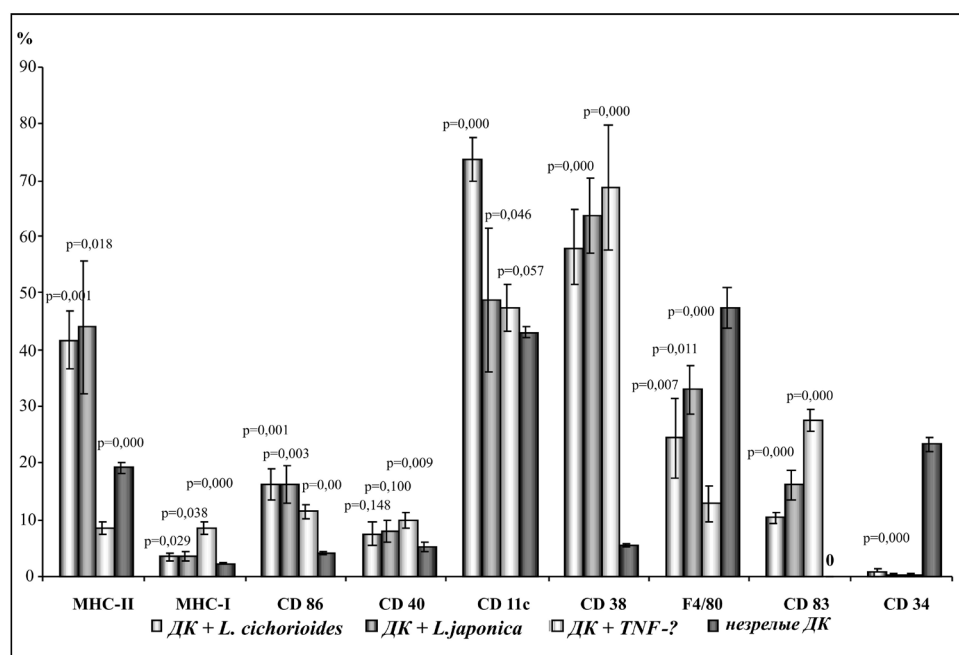


Рис. 8.4. Влияние фукоиданов на экспрессию поверхностных молекул дендритных клеток, генерированных из костного мозга мышей

Увеличение экспрессии активационного маркера CD38 и молекулы адгезии CD11c под действием фукоиданов ($58,0 \pm 3,85$ и $63,6 \pm 3,84$) по сравнению с контролем ($5,43 \pm 0,14$) указывает на способность созревших ДК взаимодействовать с Т-лимфоцитами. При этом фукоидан из *L. cichorioides* способствовал более выраженному увеличению экспрессии молекулы адгезии CD11c ($73,63 \pm 2,23\%$) по сравнению с фукоиданом из *L. japonica* ($48,76 \pm 7,35\%$) и контролем ($43,13 \pm 0,55\%$).

Для эффективной активации Т-лимфоцит должен получить от антигенпрезентирующей клетки не только антигенспецифический, но и костимулирующий сигнал. Фукоиданы из *L. cichorioides* и *L. japonica* вызвали значительное увеличение экспрессии молекулы МНС II класса ($41,8 \pm 2,9\%$ и $44,03 \pm 6,49\%$ соответственно) по сравнению с показателями в контроле ($19,07 \pm 0,63\%$).

При исследовании костимулирующих молекул на поверхности ДК, созревших под действием фукоиданов из *L. cichorioides* и *L. japonica*, показано небольшое увеличение экспрессии CD40 ($7,53 \pm 1,18\%$ и $7,96 \pm 1,17\%$) по сравнению с контролем ($5,23 \pm 0,5\%$) и значительное увеличение экспрессии CD86 ($16,2 \pm 1,55\%$ и $16,17 \pm 1,93\%$ соответственно) по сравнению с контролем ($4 \pm 0,11\%$), что свидетельствует о способности ДК к активации наивных Т-клеток и их дифференцировке в эффекторные лимфоциты.

Известно, что TLRs являются одними из рецепторов ДК, ответственных за распознавание консервативных патоген-ассоциированных молекулярных структур различных классов патогенов, что ведет к выработке и передаче сигналов для экспрессии разнообразных генов иммунного ответа. Результаты исследования экспрессии TLRs показали (рис. 8.5), что фукоиданы способствуют увеличению экспрессии TLR2 и TLR4 на ДК, но не оказывают влияния на экспрессию TLR9.

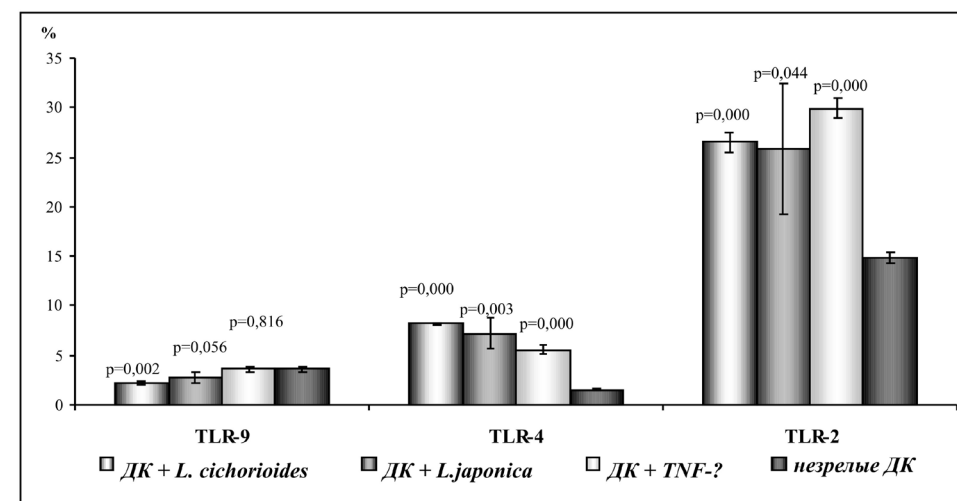


Рис. 8.5. Влияние фукоиданов на экспрессию Toll-рецепторов

Увеличение экспрессии TLR-2 под действием фукоиданов из *L. cichorioides* и *L. japonica* составило $26,5 \pm 1,04\%$ и $25,8 \pm 3,78\%$ по сравнению с контролем ($14,8 \pm 0,3\%$), а увеличение экспрессии TLR-4 — соответственно $8,13 \pm 0,08\%$ и $7,2 \pm 0,89\%$ по сравнению с показателями в контроле ($1,46 \pm 0,08\%$).

Таким образом, фукоиданы из бурых водорослей *L. cichorioides* и *L. japonica*, являются индукторами созревания ДК, о чем свидетельствуют увеличение маркера терминальной дифференцировки, экспрессия молекулы адгезии, поверхностных костимулирующих и антигенпредставляющих молекул, активационного маркера, способствующих образованию иммунного синапса для обмена информацией между АПК и Т-лимфоцитами, и дифференцировке активированных Т-клеток в эффекторные Т-лимфоциты.

В процессе созревания ДК теряют способность захватывать антиген, но взамен приобретают способность экспрессировать процессированный пептидный антиген в контексте собственных молекул МНС I и МНС II классов. Представление пептида в комплексе с МНС I класса необходимо для активации CD8-лимфоцитов, тогда как представление пептида в комплексе с МНС II класса необходимо для активации CD4+ Т-лимфоцитов (Th1) (Пащенко, Пинегин, 2001). Выраженное увеличение экспрессии молекулы МНС II класса на поверхности ДК, созревших под действием фукоиданов, является одним из важных показателей способности этих клеток осуществлять функцию антигенного представления и позволяет считать существование прямого представления ДК антигена в комплексе с МНС II класса CD4+ Т-клеткам. Увеличение костимулирующих молекул (CD40 и CD86) свидетельствует о том, что полученные ДК способны активировать наивные Т-клетки.

Действие фукоиданов на созревание ДК мышей было сопоставимо с эффектом классического индуктора созревания ДК — TNF α . В наших исследованиях (Запорожец, 2006; Запорожец, Беседнова, 2007) показано, что СПС индуцируют синтез и секрецию провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 и IL-8) клетками моноцитарно-макрофагального ряда, что способствует экспрессии молекул адгезии, активации Нф, Мф и НК-клеток, усилению фагоцитоза и пролиферации лимфоцитов, а также увеличению синтеза НК-клетками IFN γ . Созревание ДК инициируется различными факторами, к которым относятся TNF-подобные сигналы и провоспалительные цитокины. Поэтому способность фукоиданов индуцировать синтез провоспалительных цитокинов, в частности, TNF α , может являться одним из механизмов действия исследованных фукоиданов на созревание ДК. Полученные нами результаты согласуются с данными корейских ученых (Kim, Joо, 2008), которые показали, что фукоидан из морской водоросли *F. vesiculosus* увеличивает экспрессию маркерных генов, связанных с созреванием ДК.

Характер иммунного ответа во многом определяется цитокинами, которые секретируются ДК при контакте с Т-лимфоцитами. Уровень

цитокинов мы определяли в супернатантах культур ДК, культивированных в присутствии фукоиданов из бурых водорослей *L. cichorioides* и *L. japonica*. В качестве референс-препарата (положительный контроль) использовали TNF α . Контролем служили незрелые ДК. Изучение иммунофенотипических характеристик ДК, полученных из костного мозга мышей, проводили на разных стадиях созревания.

Созревшие под действием фукоиданов ДК характеризовались фенотипом: CD34^{-/+}, CD38⁺, CD40⁺, CD11c⁺, CD86⁺, CD83⁺, МНС I⁺, МНС II⁺.

Под действием фукоиданов из бурых водорослей *L. cichorioides* и *L. japonica* (рис. 8.6) отмечен высокий уровень продукции TNF α (186,3 \pm 5,8 пг/мл и 198 \pm 6,4 пг/мл соответственно) по отношению к контролю - незрелым ДК (33,4 \pm 2,3 пг /мл). Однако самый высокий показатель установлен при добавлении в среду культивирования классического индуктора созревания ДК - TNF α (240 \pm 4,3 пг/мл).

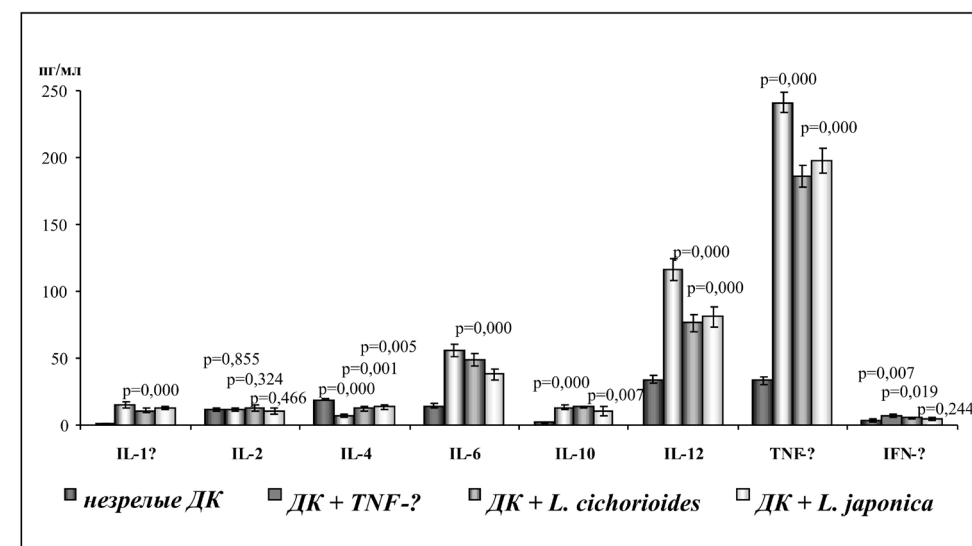


Рис. 8.6. Уровень цитокинов, продуцируемых ДК под действием сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей *in vitro*

ДК, стимулированные фукоиданами из *L. cichorioides* и *L. japonica* продуцировали высокий уровень иммунорегуляторного цитокина IL-12 (76,4 \pm 2,68 и 81,3 \pm 3,09 пг/мл) по сравнению с незрелыми ДК (34,2 \pm 1,22 пг/мл), а также провоспалительные цитокины — в большей степени IL-6 (48,2 \pm 1,98 и 38,3 \pm 1,62 пг/мл, соответственно) по отношению к контролю 14,3 \pm 0,88 пг/мл и в меньшей степени IL-1 β (11,2 \pm 0,76 и 13,1 \pm 0,47 пг/мл), в сравнении с контролем - 1,03 \pm 0,29 пг/мл.

Таким образом, результаты исследования демонстрируют, что под

воздействием фукоиданов из бурых водорослей ДК приобретают способность к синтезу регуляторного (IL-12) и провоспалительных (IL-1 β , IL-6, TNF- α) цитокинов.

Усиление продукции ДК IL-12 способствует дифференцировке Th1, продуцирующих IFN γ и IL-2, которые совместно с IL-12 повышают антимикробную активность Мф, способствуют активации NK, NKT и Т-лимфоцитов, индуцируя пролиферацию, цитотоксическую активность и дифференцировку Th клеток. В свою очередь, активированные NK и Т-клетки, продуцируют IFN γ , что свидетельствует о существовании позитивной обратной связи между эффекторами адаптивного и врожденного иммунитета

Полученные нами результаты исследования согласуются с данными Mi-Hyoung Kim и Hong-Gu Joo (2008), которые показали, что фукоидан из бурой водоросли *Fucus vesiculosus* индуцирует созревание ДК и продукцию цитокинов (IL-12p70, TNF- α и IFN- γ), что по мнению авторов направляет дифференцировку Т-клеток по Th1-типу (Kim 2008).

Увеличение уровня цитокинов, продуцируемых активированными фукоиданами дендритными клетками, свидетельствуют о потенциале ДК поляризовать иммунный ответ по Th1 типу и предъявлять различные антигены Т-лимфоцитам, которые дифференцируются в специфические эффекторы адаптивного иммунитета.

Действие сульфатированных полисахаридов на функциональную активность нейтрофильных лейкоцитов

Нейтрофилы так же, как и ДК являются одним из важнейших элементов врожденного иммунитета. От функциональной полноценности этих клеток во многом зависит генез, течение и исход многих патологических состояний. Нейтрофильные лейкоциты продуцируются в костном мозге под влиянием IL-1, IL-3, IL-5, GM-CSF и G-CSF и представляют собой первую линию защиты, экстренно мобилизуясь в очаг воспаления или инфекции, под действием специфических рецепторов — селектинов. В самом начале воспалительного процесса на поверхности тромбоцитов и эндотелиальных клеток экспрессируется Р-селектин. Его природными лигандами являются фрагменты биогликанов, содержащие тетрасахаридные звенья в сочетании с остатками сульфата тирозина (Unger, 2001). Сульфатированные полисахариды, в том числе, фукоиданы, обладают способностью ингибировать взаимодействие Р-селектина с этими лигандами (Ушакова и др., 2005; Fritzsche et al., 2006).

Вопрос о влиянии фукоиданов на хемотаксис Нф до сих пор остается дискуссионным. А.В. Семенов и др. (1999) показали значительное по-

давление миграции Нф в брюшную полость мышей при внутривенном введении фукоидана в течение 15 мин — 1,5 часов. По мнению авторов, блокада воспаления на ранней стадии его развития происходит за счет взаимодействия фукоидана с Р-селектином. Ингибирование миграции лейкоцитов к стандартному хемоаттрактанту и частичная блокада адгезии Нф к эндотелиальным клеткам сульфатированными полисахаридами, выделенными из красных микроводорослей, показаны и в работе M.S. Matsui et al. (2003). На модели артрита крыс, вызванного введением зимозана, было показано снижение притока лейкоцитов в очаг воспаления под действием фукоидана, полученного из бурой водоросли *F. evanescens* (Cardoso et al., 2010). На модели острого экспериментального перитонита, вызванного у крыс введением пептона, D.O. Croci et al. (2011) показали, что блокирование L- и Р-селектинов на Нф фукоиданом (Pat. US 7056520; Choi et al., 2010) приводит к купированию острого воспаления, а также к статистически достоверному уменьшению притока в очаг полиморфноядерных лейкоцитов. Экстракт зеленой водоросли *Ulva lactuca* также оказывал выраженное противовоспалительное действие, способствуя уменьшению отека лап у крыс с экспериментальным воспалением, предположительно за счет подавления медиаторов воспаления (гистамина, серотонина и простагландина) (Margret et al., 2009).

С другой стороны, исследования Д.В. Незговорова и др. (2005) показали, что через 15-20 мин после внутрибрюшинного введения фукоидана мышам наблюдается нейтрофильная экссудация в месте введения, достигающая максимума через сутки и сохраняющаяся в течение месяца. Через 72 часа после введения полисахарида в перитонеальной полости увеличивалось содержание моноцитов и макрофагов. Аналогичные результаты представлены в работе Ishihara et al., (1999). Фукоиданы стимулировали также мобилизацию стволовых кроветворных клеток *in vivo* при введении селектиндефицитным обезьянам и мышам, что позволило авторам (Sweeney et al., 2000) сделать заключение о существовании селектин-независимого действия фукоиданов, механизм которого может быть опосредован выбросом из костного мозга в кровь потенциального хемоаттрактанта — стромального фактора. Стимуляцию миграции Нф сульфатированными полисахаридами из красной морской водоросли *Champia feldmannii* через 1 час после введения экспериментальным животным (крысам, мышам) показали A.M.S. Assreuy et al. (2008).

Противоречивость данных, полученных авторами, по-видимому, обусловлена использованием различных экспериментальных моделей, временных параметров и способов введения фукоидана относительно изучаемого феномена (воспаление, опухоль), а также механизмов, опре-

деляющих конечный эффект препарата. Очевидно, что при внутривенном введении (или местной аппликации в область воспаления), когда фукоидан блокирует селектины на эндотелиоцитах, реализуются его противовоспалительные свойства (снижение миграции Нф) в ранние сроки после введения. В более поздние сроки — через 24 часа после внутрибрюшинного введения - провоспалительные свойства фукоидана (усиление синтеза провоспалительных цитокинов, способность активировать адгезию и фагоцитоз Нф, продукцию ими АФК, а также повышать экспрессию рецепторов адгезии CD11b, CD18, FcR, C3R, продукты которых – ЛТВ4, IL-1 — в свою очередь усиливают адгезивность эпителия) обеспечивают миграцию Нф в очаг инфекции. В случае увеличения миграции Нф в брюшную полость при внутрибрюшинном введении фукоидана ведущую роль, по-видимому, играет способность к усилению продукции цитокинов, в частности, TNF α , IL-8.

Действие СПС на фагоцитарные процессы в Нф представлено в литературе достаточно подробно (Незговорев и др., 2005; Запорожец, 2006; Запорожец, Беседнова, 2007; Кузнецова, 2009; Hsu et al., 2003; Vetvicka, Yvin, 2004). Установлено, что изменения в окислительном метаболизме Нф, производимые фукоиданами, зависят от исходного состояния клетки (норма, депрессия, стимуляция) и дозы активирующего полисахарида, обеспечивающей прайминг или активацию клетки. При действии фукоидана на покоящиеся нейтрофилы эти клетки мобилизуют свои резервные возможности. При действии на нейтрофилы с циклофосфаниндуцированной депрессией фукоиданы восстанавливают нарушенные функции клеток, а увеличение показателей спонтанного НСТ-теста в системе *in vitro* свидетельствует о прямом стимулирующем действии фукоидана на клетку (Запорожец, 2006).

В ряде работ исследовали способность СПС стимулировать кислород-зависимые механизмы цитотоксичности нейтрофилов, а также влияние на этот процесс структурных особенностей биополимеров. Фукоидан из фукусовых водорослей стимулировал выработку супероксиданиона Мф и Нф, что рассматривается авторами как способность провоцировать воспалительную реакцию, тогда как фукоидан из водоросли *Cladosiphon osamuranus* этого эффекта не вызывал. В наших работах (Запорожец, 2006; Запорожец, Беседнова, 2007) показано, что в модельной системе *in vitro* инкубация Нф с фукоиданом в течение 30 мин обеспечивает усиление способности фагоцитов к спонтанной индукции свободных радикалов.

Следует заметить, что способ введения фукоидана, полученного из водоросли *F. evanescens*, не оказывал значительного влияния на функциональную активность нейтрофилов в экспериментах *in vivo* (Кузнецова, 2009).

Установлена способность фукоидана модифицировать ферментативные процессы в клетке - в одних случаях увеличивать синтез ферментов, в других - усиливать процесс секреторной дегрануляции. Инкубирование фукоидана с Нф приводило к снижению активности миелопероксидазы как в клетках, так и в супернатантах. Количество катионных белков в Нф снижалось, причем в стимулированных опсонизированным зимозаном клетках — в большей степени, чем в покоящихся.

Изменение активности внутриклеточно расположенных ферментов может определяться двумя процессами: синтезом активных форм фермента, происходящим за счет связывания с коферментом внутри клетки, и экскрецией фермента во внеклеточное пространство. В зависимости от преобладания того или другого процесса возможно как усиление, так и снижение активности внутриклеточно расположенных ферментных систем (Пинегин и др., 1994). В связи с этим можно полагать, что добавление фукоидана в клеточные культуры покоящихся Нф усиливало процессы синтеза кислой фосфатазы, тогда как при стимуляции клеток опсонизированным зимозаном действие полисахарида определялось усилением секреторной дегрануляции, сопровождающейся усилением активности кислой фосфатазы в супернатантах.

Полученные результаты интересны с точки зрения возможности использования фукоидана в различных ситуациях. В частности, при фагоцитозе живых объектов киллинг патогенов начинается еще до поглощения, за счет выброса во внеклеточную среду бактерицидных продуктов гранул, а также высокоактивных форм кислорода, являющихся итогом респираторного взрыва. Внеклеточная атака бактерицидными системами оправдана и тогда, когда фагоцитоз затруднен из-за размеров объекта или прочной связи антигена с внеклеточными структурами. Этими свойствами в полной мере обладает миелопероксидазная бактерицидная система азурофильных гранул Нф, содержащая в своем составе миелопероксидазу, перекись водорода, галогены, кислую фосфатазу (Бакуев и др., 1991). В то же время, когда микроорганизмы расположены внутриклеточно, увеличение активности ферментов внутри клетки, достигаемое воздействием стимулятора, обеспечивает благоприятные условия для уничтожения патогенов. В этой связи способность фукоиданов в одних случаях увеличивать синтез ферментов, в других - усиливать процесс секреторной дегрануляции дает определенную возможность управления фагоцитозом, модифицируя ферментативные процессы в клетке.

Важное место среди кислороднезависимых факторов, вызывающих повреждение микробной мембраны, занимает система неферментных катионных белков, содержащихся в специфических гранулах нейтрофилов.

Катионные белки находятся в синергическом взаимодействии с системой миелопероксидаза – перекись водорода. Происходящие при фагоцитозе процессы дегрануляции (в данном случае декатионизации) имеют огромное значение в реализации функций Нф. Задержка декатионизации гранулоцитов прямо коррелирует со снижением переваривающей способности Нф (Бабаченко и др., 1993). В этой связи способность фукоидана стимулировать декатионизацию Нф (Запорожец, 2006) вносит вклад в совокупный эффект, опосредующий в конечном итоге усиление фагоцитоза.

Стимулирующее действие фукоидана на систему нейтрофилов, как интактных *in vitro*, так и в условиях экспериментальной инфекции, послужили основанием для детального и сравнительного изучения влияния фукоидана на функциональную активность Нф при экспериментальном иммунодефицитном состоянии, индуцированном циклофосфаном *in vitro* и *in vivo*. Воспроизведение модели циклофосфаниндуцированной депрессии выражалось в значительном угнетении рецепторного аппарата и адгезивной активности Нф, функции захвата и поглощения бактерий, антигенного киллинга и переваривания. При этом значительно снижался потенциал кислородзависимых бактерицидных систем Нф, как покоящихся, так и активированных. В этих условиях фукоидан проявлял преимущественно иммунокорректирующие свойства, имеющие характер «модуляции с элементами стимуляции», восстанавливая нарушенные функции нейтрофилов. Обращает на себя внимание тот факт, что способность фукоидана восстанавливать функциональную активность Нф в условиях депрессии была выражена при действии как на интактные клетки, в дальнейшем обработанные циклофосфаном, так и при действии на клетки, функциональная активность которых уже была снижена. Эти результаты интересны с точки зрения использования фукоидана как с профилактической целью - в ситуациях, связанных с последующей депрессией функции Нф, так и в лечебном режиме — для восстановления их активности (Запорожец, 2006).

Учитывая данные литературы и собственные результаты, мы можем полагать, что взаимодействие Нф с фукоиданом вызывает праймирование фагоцитов к более эффективному ответу на последующий активационный сигнал (опсонизированный зимозан). Начальная внеклеточная фаза обусловлена контактом рецепторов Нф (CR3, FcR), экспрессия которых усиливается фукоиданом. Как следствие этого, активируются мембранные механизмы бактерицидности (НАДФ-Н-оксидазы, гексозомонофосфатный шунт, продукция супероксиданиона, гидроксильного радикала, синглетного кислорода), отражением которых является увеличение показателей НСТ-теста при воздействии фукоидана на Нф. Последу-

ющие события включают внутриклеточные механизмы фагоцитоза, в частности, секреторную дегрануляцию, сопровождающуюся изменением активности кислой фосфатазы, декатионизацией Нф, выбросом миелопероксидазы в окружающую среду, вследствие чего активность этого фермента в клетках, активированных фукоиданом, снижается.

Таким образом, возможность фармакологической регуляции фукоиданами функций нейтрофилов, играющих значительную роль в индукции врожденного иммунитета, открывает перспективы рационального воздействия на воспаление, репаративные и регенеративные процессы в организме, а также устойчивость к вирусным, бактериальным, грибковым и паразитарным болезням.

Взаимодействие сульфатированных полисахаридов с макрофагами

Макрофаги, одни из ключевых антиген-презентирующей клетке, участвуют в противовирусной, противомикробной, противоопухолевой защите, в регенерации, репарации тканей и координируют функции различных звеньев иммунной системы.

В настоящее время установлено, что сульфатированные полисахариды при взаимодействии с Мф усиливают функциональную активность этих клеток путем взаимодействия с TLR4, кластером дифференцировки CD14, рецепторами комплемента CR-3, 4, и SR (scavenger-рецепторы), которые передают сигнал внутрь клетки при помощи митоген активированных протеинкиназ MAPK (Ale et al., 2011; Запорожец, 2006; Запорожец, Беседнова, 2007; Ермак и др., 2009; Hwang et al., 2010). Доказано, что фукоиданы являются лигандами для scavenger-рецепторов, участвующих в поглощении Мф объектов фагоцитоза (микроорганизмов, поврежденных клеток, липопротеинов-оксидов) и индукции клеточного иммунного ответа, включая продукцию провоспалительных цитокинов и оксида азота (Mytar et al., 2004; Запорожец, 2006).

В работах Т.С. Запорожец и Н.Н. Беседновой (2007) исследована и описана ультраструктура макрофага под действием фукоидана. Изменения, индуцируемые фукоиданом (рис.8.7), характеризовались появлением признаков, свидетельствующих об активации клеток, и сопровождалась увеличением их размеров, образованием псевдоподий и вакуолизацией цитоплазмы (Запорожец, Беседнова, 2007).

Закономерности, которые мы установили при изучении влияния фукоидана на эффекторные функции макрофагов, были подобны выявленным для нейтрофилов: дозозависимо усиливалась способность Мф к адгезии, продукции активных форм кислорода, экспрессии мембранных рецепторов, поглощению и перевариванию патогенных

микроорганизмов. Фукоидан был активен как *in vivo*, так и *in vitro*, демонстрируя прямое действие на мембраны клеток.

Фукоиданы вызывают стойкое и длительное снижение уровня в макрофагах 5' — нуклеотидазы — одного из основных эктоферментов пуринового обмена, локализующегося в плазматической мембране и играющего значительную роль в регуляции вне- и внутриклеточного уровня аденозинового обмена, что свидетельствует о стимуляции Мф (Запорожец, Беседнова, 2007).

Сульфатированный полисахарид красной водоросли - каппа-каррагинан - усиливает активность лизосом Мф мышей, что выражается в увеличении размеров органелл, их количестве и степени закисления (Ермак и др., 2009). На основании данных литературы (Roshia de Souza et al., 2007) и собственных исследований авторы делают предположение, что это может быть обусловлено высокой степенью сульфатирования полисахарида.

Фукоиданы оказывают влияние на кислородзависимые механизмы цитотоксичности макрофагов (Запорожец, 2006; Запорожец, Беседнова, 2007; Hwang et al., 2010). Инкубирование Мф с фукоиданами из бурых водорослей, обеспечивает значительное усиление способности этих клеток к спонтанной продукции свободных радикалов, при этом эффект носит дозозависимый характер (Hwang et al., 2010).

Под действием сульфатированных полисахаридов, повышается продукция оксида азота, что может обуславливать их антиадгезивные и антикоагулянтные свойства, так как оксид азота предупреждает тромбообразование, ингибируя агрегацию и адгезию тромбоцитов через нитрование белков, которые приобретают в результате антиагрегационные свойства. Так, показана способность фукоидана из бурой водоросли *L. angustata var. Longissima* повышать уровень NO, стимулировать экспрессию iNOS-2 и COX-2, а также секрецию ПГЕ2, IL-6, IL-12 (Hang et al., 2005; Leiro et al., 2007). Установлена способность ацетилированного фукоидана из водоросли *Cladosiphon ocamuranus* активировать Мф мышей клеточной линии RAW264 через мембранные рецепторы TLR4, CD14 и SPA, а также по митогенактивированному протеинкиназному пути с последующей продукцией NO, TNF α и IL-6. Результаты иммуно-блот-анализа позво-

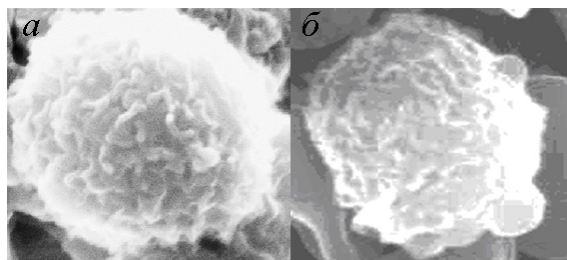


Рис. 8.7. Морфологические изменения макрофагов под действием фукоидана. Сканирующая электронная микроскопия (увеличение $\times 5.000$); а — фукоидан; б — контроль (интактный макрофаг)

лили установить, что фукоидан активировал митоген-ассоциированные протеинкиназы (38MPK и SAPK/JNK), играющие важную роль в клеточных реакциях на внешние стрессовые сигналы. Аналогичные результаты получены и при исследовании фукоидана из *L. angustata var. Longissima*, при этом, авторами прослежена связь между наличием сульфатных и ацетильных групп в фукоидане и продукцией NO (Teruya et al., 2010).

Специализированным классом глиальных клеток ЦНС, фагоцитов мезодермального происхождения являются клетки микроглии, уничтожающие инфекционные агенты за счет продукции NO и H₂O₂. Чрезмерная активация микроглии может приводить к возникновению патологических процессов, в частности, к гибели нейронов, что является одним из патогенетических механизмов болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, деменции, вызванной ВИЧ и др. (Wilkinson, 2001). В работе Y.Q. Cui et al., (2010) показан ингибирующий эффект различных концентраций фукоидана на процесс активации клеток микроглии, которые подвергали воздействию ЛПС. Установлено, что фукоидан не ингибировал продукцию митогенактивированной протеинкиназы (c-JunN), снижал продукцию NO, экспрессию mRNA и белка, фосфорилирование p38 и ERK и препятствовал активации и изменениям морфологии клеток микроглии, обусловленных влиянием ЛПС (Cui et al., 2010).

Особое значение в механизме иммуномодулирующей активности сульфатированных полисахаридов отводится способности индуцировать синтез и секрецию провоспалительных цитокинов клетками моноцитарно-макрофагального ряда.

Полученные результаты наших исследований позволяют заключить, что сульфатированные полисахариды усиливают спонтанную и стимулированную секрецию провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 α , IL-8), продуцируемых клетками периферической крови, при их исходно нормальных и сниженных значениях и не изменяют или снижают при высоких значениях спонтанной секреции (Запорожец, 2006; Запорожец, Беседнова, 2007).

Стимуляцию продукции интерлейкинов и хемокинов сульфатированными полисахаридами описали и другие авторы. Так, J.B. Lee et al., (2010) показали, что сульфатированный галактан из *Codium fragile* индуцировал повышенный синтез таких цитокинов, как IL-1 β , IL-6, IL-10 и TNF α . Данные этих авторов подтверждают, что иммуностимулирующий эффект сульфатированных полисахаридов осуществляется, в том числе, и через активацию макрофагов. В других случаях было отмечено, наоборот, ингибирование синтеза цитокинов под действием фукоидана, полученного из *F. vesiculosus* (Zhang et al., 2001; Kwack et al., 2010).

В исследовании Yim et al. (2005) макрофаги, полученные от мышей,

которым вводили сульфатированный полисахарид из микроводорослей *Gyrodinium impudicum*, продуцировали высокий уровень цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF β , а также обладали туморицидным действием по отношению к клеткам лимфомы мышей YAC-1.

Повышенная продукция провоспалительных цитокинов может быть механизмом, который обеспечивает влияние полисахаридов на развитие воспалительной реакции на ранних этапах инфекционного процесса и вызывает увеличение экспрессии молекул адгезии, активацию Нф, Мф и NK-клеток, усиление фагоцитоза и продукции супероксидных радикалов фагоцитами, пролиферацию лимфоцитов, а также увеличение синтеза IFN γ NK-клетками.

Антитела, секретируемые В-лимфоцитами, связывают антигены с образованием иммунных комплексов, которые распознаются и удаляются с помощью фагоцитоза Мф, имеющими для них высокоаффинные рецепторы (FcR). Другим лигандом для стимуляции фагоцитоза являются иммунные комплексы, активированные комплементом и связывающие рецепторы для C3b. Мы показали, что макрофаги в присутствии фукоидана экспрессировали большое количество Fc γ R и C3bR относительно контроля.

Сульфатированные полисахариды, вызывая активацию врожденного иммунитета, стимулируют и противоопухолевую активность Мф и NK-клеток (Miao et al., 2004; Wu, Chen, 2006; Sun et al., 2010; Wang et al., 2010). Значительную роль в ремоделировании тканей, ангиогенезе, пролиферации, миграции и дифференцировке клеток, апоптозе, сдерживании роста опухолей, расщеплении мембранных рецепторов, выбросе апоптозных лигандов, таких как FAS, а также в активации хемокинов и цитокинов играют металлопротеиназы (MMP) — ферменты, способные разрушать все типы белков внеклеточного матрикса (Hirose et al., 2008). Одним из механизмов противоопухолевого действия фукоиданов может являться их способность повышать секрецию MMP, индуцированную TNF α на клеточной линии моноцитов человека U937, а также снижать уровень экспрессии на моноцитарных клетках CD44, являющегося маркером меланомы и рецептором MMP-9 (Jintang et al., 2010).

Взаимодействие сульфатированных полисахаридов с NK-клетками

Натуральные киллеры (NK-клетки) являются важным элементом системы врожденного иммунитета, принимая участие практически во всех реакциях иммунной системы (Ikeda et al., 2004). NK-клетки активно участвуют в межклеточных взаимодействиях, будучи активированы цитокинами (TNF α , IL-12, IL-1 α), которые выделяют Мф при проникновении микроба в макроорганизм. NK клетки вносят вклад в развитие

Th1-иммунного ответа, синтезируя IFN γ , TNF α , стимулируют гемопоэз (GM-CSF), усиливают воспалительную реакцию в очаге (IL-8), лизируют клетки, инфицированные внутриклеточными возбудителями, и ингибируют размножение микроорганизмов.

Киллерная активность NK-клеток может быть существенно повышена при воздействии стимулирующих агентов, в частности, сульфатированных полисахаридов. В наших исследованиях было установлено стимулирующее действие фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* на цитотоксическую активность этих клеток-эффекторов (Запорожец, 2006; Запорожец, Беседнова, 2007).

Одним из признаков повышения функциональной активности NK-клеток является усиление экспрессии низкоаффинного компонента FcR (Fc γ RIIA(CD16), присутствующего на NK-клетках (Тотолян, Фрейдлин, 2000). Доказано, в частности, что связывание Fc γ RIIA(CD16) NK-клеток с Fc фрагментом IgG против вирусных антигенов, появляющихся на поверхности клеток-мишеней, является критическим в обеспечении активации NK-клеток и развитии антителозависимой клеточной цитотоксичности и опосредовано изменениями в фосфорилировании тирозина внутриклеточных белков (Godfrey et al., 2006). Наши исследования (Запорожец, Беседнова, 2007) показали возможность значительного усиления экспрессии Fc γ R(CD16) на мембранах клеток фукоиданом из водоросли *F. evanescens*.

Туморицидный эффект NK-клеток под действием сульфатированных полисахаридов отмечен многими авторами (Ghosh et al., 2009; Sun et al., 2010). Учитывая существенную роль этих клеток во врожденном иммунитете организма и клеточно-опосредованном иммунном ответе, обусловленную способностью продуцировать и секретировать иммунорегуляторные цитокины, лизировать клетки, инфицированные внутриклеточными возбудителями, ингибировать размножение микроорганизмов и уничтожать клетки опухолей становится очевидным значение усиления их функциональной активности сульфатированными полисахаридами. Усиление функциональной активности NK-клеток может быть одним из механизмов противовирусного, антиопухолевого, антибактериального и антипаразитарного действия этих биополимеров.

Таким образом, способность сульфатированных полисахаридов стимулировать функциональную активность дендритных клеток, нейтрофилов, макрофагов и NK клеток является механизмом, обеспечивающим развитие раннего неадаптивного ответа — врожденного иммунитета - на инфекцию с вовлечением широкого круга эффекторных механизмов, направленных на разные классы патогенов.

Взаимодействие сульфатированных полисахаридов с системой комплемента

Протеолитические каскады комплемента являются важнейшими инструментами защиты организма от инфекции, одним из самых значимых компонентов врожденного иммунитета. Продукты активации комплемента принимают участие в солюбилизации иммунных комплексов (Zarkadis et al., 2001), регуляции проницаемости сосудистой стенки, процесса гемокоагуляции. Комплемент участвует в воспалительном ответе организма и является посредником между врожденным и адаптивным иммунитетом (Grace et al., 2002; March et al., 2004). Система комплемента интегрирует работу всей иммунной системы, о чем свидетельствует наличие рецепторов к компонентам комплемента на иммунокомпетентных клетках. Рецепторы к С3b-компоненту обнаружены на Мф, Нф, В-лимфоцитах, к фактору В альтернативного пути – на В-лимфоцитах, к С1q-субкомпоненту – на Мф, лейкоцитах, тромбоцитах.

Различные экзогенные вещества могут влиять на систему комплемента, усиливая или подавляя его активность (Козлов и др., 2007). Вместе с тем избыточная активация комплемента лежит в основе многих патологических состояний человека таких, как ангионевротический отек (De и Serres et al., 2003; Meletis, Terpos, 2003), пароксизмальная ночная гемоглобинурия (Meletis, Terpos, 2003), инфаркт миокарда (Vermeiren et al., 2000), инсульт (Yasuda, Takeuchi, 1990), гломерулонефрит (Суханов и др., 2003), ожоги (Nakae et al., 2000), сепсис (Cheong et al., 2004) и др. Альтерирующее действие комплемента проявляется также при болезни Альцгеймера (Wilkinson, 2001), миастении (Kaminski et al., 2004), атеросклерозе (Lopaschuk, 2001), аутоиммунных заболеваниях (Jakobs et al., 1998). Ограничения избыточной активации комплемента, выступающего в качестве фактора альтерации и углубляющего течение патологических процессов, при этом могут стать благоприятными для организма. Это делает проблему ограничения активности комплемента очень актуальной. Наиболее эффективным и регулируемым является ограничение повреждающего действия комплемента с помощью ингибиторов системы комплемента, которые могут являться средствами патогенетической терапии.

Как антикомплементарные молекулы первыми были описаны водорослевые фуканы из *A. nodosum* (Blondin et al., 1994). Исследуя радиоиммунным методом компоненты, субкомпоненты и продукты активирования после воздействия сульфатированных полисахаридов, авторы пришли к выводу об ингибировании этими соединениями как классического, так и альтернативного пути активации комплемента. Вслед за этим со-

общением последовали и другие работы, в том числе и дальневосточных ученых, которые касались фукоиданов из водорослей *F. evanescens*, *L. japonica*, *L. cichorioides*, *L. guryanovae* (Назарова, 1999; Zvyagintseva et al., 2000; Назарова и др., 2001).

Наиболее активно ингибируют систему комплемента только отрицательно заряженные полисахариды. Высокомолекулярные полисахариды оказывают большее влияние на систему комплемента, чем низкомолекулярные, при этом фукоиданы с высоким содержанием фукозы более интенсивно влияют на реакции активированного комплемента по классическому и альтернативному пути, чем фуканы с низким содержанием фукозы (Назарова, 1999; Zvyagintseva et al., 2000). Разветвленные фуканы обладают более сильным антикомплементарным действием по сравнению с линейными структурами (Clement et al., 2010).

Фукоидан из водоросли *A. nodosum* блокирует потребление белков С2, С4 и, в меньшей степени С3 (Tissot et al., 2003a), а также препятствует развитию первого этапа классического пути активации комплемента, что создает противовоспалительный эффект последующих продуктов каскада (Tissot et al., 2003b).

В связи с антикомплементарными свойствами сульфатированные полисахариды из водорослей являются перспективными для лечения эндотоксического шока и других иммунопатологических состояний, обусловленных чрезмерной активацией системы комплемента. Повидимому, противовоспалительная и антикомплементарная активности этих соединений могут обуславливать и противоаллергическое действие (Blondin et al., 1994; Tissot et al., 2003).

По данным Т.А. Богомаз (2006) мишенью для действия фукоидана является компонент комплемента С1q (Богомаз, 2006). Этот вывод находит подтверждение в работе В. Tissot et al. (2003), где авторы показали, что фукоидан из водоросли *A. nodosum* образует комплекс с очищенным компонентом С1q, взаимодействует с коллагеноподобными участками С1q, препятствует его ассоциации с С1r2С1s2, а следовательно и активации КПК.

Описанное в литературе противовоспалительное действие фукоидана Т.А. Богомаз (2006) объясняет тем, что субкомпонент С1q выступает в роли лиганда С1Q рецепторов различных клеток, в том числе, полиморфноядерных лейкоцитов (Бичучер, Козлов, 2007). Взаимодействие С1q с рецептором приводит к активации фагоцитоза. Взаимодействие С1q с рецептором приводит к активации фагоцитоза. Автор высказывает предположение, что противовоспалительное действие фукоидана опосредовано не только его взаимодействием с селектинами лейкоцитов и эндотелиальных клеток, но и способностью полисахаридов блокировать

провоспалительное действие C1q.

Фукоидан оказывает ингибирующее действие и на альтернативный путь активации комплемента (Назарова, 1999; Богомаз, 2006). Торможение фукоиданом этого пути обусловлено ингибированием реакции, катализируемой фактором D – сериновой протеиназой.

Таким образом, СПС являются эффективными ингибиторами в большей степени КПК и в меньшей — АПК, и оба пути активации блокируются на начальном этапе. При этом ингибируются все основные функции комплемента: опсонизация, комплемент-зависимый цитолиз, эффекты анафилотоксинов. Полученные данные свидетельствуют о том, что фукоиданы могут использоваться для направленной регуляции активности системы комплемента при физиологических и патологических состояниях человека.

Приведенные материалы свидетельствуют о том, что сульфатированные полисахариды бурых водорослей являются агонистами функций врожденного иммунитета и могут использоваться в качестве основы для лекарственных препаратов и фармацевтических субстанций, предназначенных для коррекции нарушенных функций при патологических состояниях, сопровождающихся иммунодефицитами.

Глава 9. Действие сульфатированных полисахаридов из водорослей на факторы адаптивного иммунитета и продукцию цитокинов

Приобретенный специфический (адаптивный) иммунитет реализуется В-лимфоцитами (гуморальный специфический иммунитет) и Т-лимфоцитами (клеточный специфический иммунитет). Основой гуморального иммунного ответа являются активация В-лимфоцитов и их дифференцировка в антителообразующие плазмочиты. Клеточный иммунный ответ проявляется в двух формах. В основе цитотоксического ответа лежит развитие Т-киллеров, которые разрушают пораженные клетки-мишени. Другая разновидность клеточного ответа — гиперчувствительность замедленного типа - имеет в своей основе реакцию макрофагов, направляемую Т1-хелперами. При развитии иммунного ответа процесс активации лимфоцитов зависит не только от связывания антигена, но и от костимулирующих сигналов Т-хелперов, которые могут осуществляться как в форме контактных взаимодействий, так и с участием цитокинов.

Адаптивная иммунная система является более эффективной, чем врожденный иммунитет в плане уничтожения чужеродных агентов, поскольку способна, хотя и с задержкой дать во много раз больший уровень по количеству и специфичности Т-эффекторных и антителопродуцирующих клеток (Лебедев, 2007).

Гуморальные факторы адаптивного иммунитета

Влияние сульфатированных полисахаридов на продукцию цитокинов.

В настоящее время цитокины выделены в новую самостоятельную систему регуляции основных функций организма, существующую наряду с нервной и эндокринной системами и связанную, в первую очередь, с поддержанием гомеостаза при внедрении патогенов и нарушении целостности тканей (Фрейдлин, 2001). Дефекты продукции и секреции цитокинов приводят к дефектам Т- и В-лимфоцитов, фагоцитирующих клеток и естественных киллеров, которые клинически проявляются комбинированными иммунодефицитными состояниями разной степени выраженности с рецидивирующими инфекциями, генерализацией гнойно-воспалительных процессов и другой иммунопатологией (Ярилин, 1999). Скоординированная продукция цитокинов играет ведущую роль в регулировании иммунных реакций, контролируя пролиферацию, дифференцировку и функции иммунокомпетентных клеток.

Принципы фармакологической коррекции дефектов цитокиновой сети включают: влияние на продукцию и секрецию цитокинов (стимуляция,

ингибция, восстановление баланса), влияние на экспрессию рецепторов цитокинов (стимуляция, ингибция или блокада), связывание и выведение избытка цитокина и вмешательство на уровне передачи сигнала от рецептора к ядру клетки (Фрейдлин, 2001). В последние годы результаты, полученные при изучении механизма действия иммуномодуляторов на молекулярном и клеточном уровнях, демонстрируют связь эффектов иммуномодуляции с микроокружением, в котором действуют препараты, включая изменение профиля цитокинов (Ярилин, 1999). Углубленное исследование цитокин-опосредованного взаимодействия клеток иммунной системы и факторов, влияющих на нее, перспективно, так как открывает принципиально новые подходы к терапии ряда заболеваний.

В механизме иммуномодулирующей активности полисахаридов особое значение имеет способность индуцировать синтез и секрецию провоспалительных цитокинов клетками моноцитарно-макрофагального ряда, способствующих экспрессии молекул адгезии, выходу нейтрофилов в воспалительный очаг, активации Нф и НК-клеток, усилению фагоцитоза и продукции супероксидных радикалов, ускорению пролиферации лимфоцитов, а также увеличению синтеза IFN γ натуральными киллерами (Bhatia et al., 2008; Leonard et al., 2012).

Повышенная продукция провоспалительных цитокинов зарегистрирована в экспериментах *in vitro* при инкубировании клеток крови с фукоиданами. Так, в работе T.Palkama (1991) приводятся данные о стимуляции синтеза IL-1 моноцитами и клетками Th-1 клеточной линии, а в экспериментах, выполненных Y.Okai et al. (1997) при изучении полисахарида, выделенного из бурых водорослей *Hijikia fusiforme*, был показан усиливающий эффект на продукцию TNF α макрофагами не отвечающих на эндотоксин СЗН/He мышей (с 240 \pm 40 pg/ml до 968 \pm 73 pg/ml). Аналогичные результаты приводят H. Shibata et al. (2000), изучавшие фукоидан, изолированный из водорослей *Cladosiphon okamuranus*. M. Tabarsa et al. (2012) исследовали действие трех СПС, выделенных из водоросли *Ulva pertusa*, и показали, что эти соединения стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов и оксида азота в клетках RAW264.7. По мнению B.Mytar et al. (2004) и M.Heinzelmann et al. (1998), способность фукоиданов к индукции синтеза цитокинов в человеческих моноцитарно-макрофагальных клетках обусловлена связыванием этого биополимера с рецепторами-мусорщиками («scavenger receptor»). Авторы подчеркивают, что фукоидан активирует моноцитарно-макрофагальные клетки для синтеза, главным образом, провоспалительных цитокинов, обеспечивая тем самым их участие в противомикробной и антиопухолевой защите. Продукция провоспалительных цитокинов, в частности,

IL-10 при этом индуцируется в значительно меньшей степени. К такому же выводу приходят H.Maruyama et al. (2005), показавшие, что фукоидан, выделенный из *Undaria pinnatifida sporophyll*, увеличивает ответ Th1 нормальных BALB/C мышей и подавляет продукцию Th2 цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13) в бронхоальвеолярной жидкости мышей после сенсibilизации аэрозолем овальбумина, что может быть полезно при аллергических воспалениях. В экспериментах *in vivo* на модели экспериментального пневмококкового менингита при внутривенном введении фукоидана показано снижение уровня TNF α и IL-1 в спинномозговой жидкости и увеличение IL-8 (Ostergaard, 2000). Поскольку фукоидан, блокируя селектины, снижает рекрутирование лейкоцитов в цереброспинальную жидкость, авторы полагают, что за реализацию продукции IL-1 и TNF α в цереброспинальной жидкости при пневмококковом менингите ответственны лейкоциты крови, мигрирующие в очаг воспаления, тогда как IL-8 может продуцироваться локальными клетками в пределах мозга. Остается открытым вопрос о том, каков механизм увеличения продукции IL-8 при введении фукоидана в этом случае.

Ряд исследований посвящен изучению зависимости биологических эффектов, в частности, цитокин-индуцирующей активности биополимеров, от их структуры (Shibata et al., 2000; Tabarsa et al., 2012). H. Shibata et al. (2000) показано, что фукоидан из фукусовых водорослей стимулировал секрецию TNF α макрофагами, что рассматривается авторами как способность провоцировать воспалительную реакцию, тогда как фукоидан из *Cladosiphon okamuranus* не вызывал этих эффектов. Оба этих фукоидана имеют (1 \rightarrow 3) связанный фукопиранозный скелет, однако отличаются по содержанию сульфатов и структурным сахарам.

В работах И.М. Ермак и др. (2009) и Е.В. Соколовой (2012) авторы, исследовавшие биологическую активность каррагинанов красных водорослей дальневосточных морей, также обращают внимание на тот факт, что способность влиять на продукцию цитокинов зависит от структуры полисахаридов и их концентрации. В диапазоне 10-1,0 мкг/мл все типы каррагинанов вызывали повышение уровней TNF α и IL-6 (по сравнению со спонтанной продукцией), в то время как при низкой концентрации они были мало активны. Наибольшей цитокин-индуцирующей активностью в области высоких концентраций обладал каппа-каррагинан, а наименьшей — лямбда-каррагинан.

Таким образом, полисахариды рассматриваются как индукторы продукции цитокинов, способные увеличивать экспрессию генов различных цитокинов и рецепторов для них, а стимуляция синтеза цитокинов этими биополимерами является одним из ведущих механизмов иммунорегу-

ляции. В то же время, цитокининдуцирующие свойства полисахаридов морского происхождения в литературе освещены мало. В этой связи нами (Запорожец, 2006) было исследовано влияние фукоидана, полученного из бурой водоросли *F. evanescens*, на спонтанную и стимулированную митогеном продукцию цитокинов, вырабатываемых преимущественно Th1 (IL-2 и IFN- γ), Th2 (IL-4) и мононуклеарными фагоцитами (TNF α , IL-1 α , IL-8) в культуре клеток цельной крови. Принимая во внимание тот факт, что интенсивность продукции цитокинов, вырабатываемых в контрольных образцах крови, заметно отличается у разных доноров, мы выделили группы доноров с исходно пониженным (или нормальным) и повышенным уровнем продукции цитокинов. Результаты экспериментов и проведенный анализ позволили установить следующие закономерности: фукоидан оказывает модулирующее влияние на продукцию цитокинов, зависящее от исходного уровня цитокина. В его действии на покоящиеся клетки преобладает регуляторный эффект: исходно низкая продукция цитокинов усиливается, исходно высокая ослабляется. Стимулированные митогеном клетки отвечают снижением продукции цитокинов в культурах клеток крови с высоким уровнем цитокина после стимуляции и увеличением продукции при низких и средних концентрациях цитокинов.

Повышенная продукция провоспалительных цитокинов может быть механизмом, который обеспечивает влияние фукоидана на развитие воспалительной реакции на ранних этапах инфекционного процесса и вызывает эффекты, показанные нами ранее: стимуляцию экспрессии молекул адгезии, выход нейтрофилов в воспалительный очаг, активацию Нф, Мф и НК, усиление фагоцитоза и продукции супероксидных радикалов фагоцитами, пролиферации лимфоцитов, а также увеличение синтеза IFN γ НК-клетками.

Спонтанная продукция IL-4 в супернатантах проб периферической крови доноров находилась в интервале значений min-max - 0 - 1,2 pg/ml, средний показатель в группе - 0,53 \pm 0,25 pg/ml. Внесение фукоидана в образцы цельной крови доноров приводило к усилению продукции цитокина, выявляемому во всех индивидуальных пробах.

Фукоидан увеличивал спонтанную продукцию IL-2, продуцируемого преимущественно субпопуляцией Th1. Учитывая центральную роль IL-2 во многих гомеостатических и защитных иммунных реакциях, способность стимулировать клональную пролиферацию Т-клеток и проявлять функции физиологического митогена для В-лимфоцитов, стимулировать рост естественных киллеров и усиливать их цитолитические функции, увеличение продукции этого цитокина фукоиданом, может обуславливать его роль в этих процессах.

Стимулирующий эффект фукоидана был выявлен на фоне исходно низкой спонтанной продукции IFN γ — основного маркера субпопуляции Th1, ответственного за развитие клеточного иммунитета, а также резко усиливающего эффекторные функции макрофагов и естественных киллеров, их антимикробную и цитотоксическую активность. Эти механизмы могут лежать в основе усиления реакции ГЗТ, наблюдаемой при введении фукоидана.

Интересные материалы приведены в работе (Katayama et al., 2012). Авторы исследовали иммуностимулирующее действие экстрактов, выделенных из водоросли *Kjelmaniella crassifolia*, имеющих разную степень вязкости. Эксперименты проводили на мышах C57Bl6, которые в течение двух недель получали экстракты в дозах 10, 30 и 100 мг/кг. Было установлено, что более высокие уровни цитокинов (IFN γ , IL-12 и IL-6), продуцируемых лимфоцитами селезенки и Пейеровых бляшек, наблюдаются при более высокой вязкости экстракта.

Действие сульфатированных полисахаридов на антителообразование у мышей

Вопросы стимуляции антителогенеза при помощи экстрактов и полисахаридов из морских водорослей освещены в ряде научных статей (Okai et al., 1998; Yim et al., 2005; Huang et al., 2010; Araya, Gupta, 2011). Н. Itoh et al. (1993) описали стимуляцию гуморального иммунитета фукоиданом, выделенным из бурой водоросли *Sargassum thunbergii*.

В экспериментах на свиньях было установлено, что фукоидан повышал уровень IgA и IgG в молозиве свиноматок и сыворотке крови поросят, вскармливаемых этими свиноматками (Leonard et al., 2012).

Полисахариды из водоросли *Ganoderma lucidum* повышали вес лимфоидных органов у иммунокомпрометированных мышей, а также увеличивали продукцию гемолитинов к ЭБ в сыворотках крови и число НК-клеток (Huang et al., 2010).

Совершенно иные данные получены Q. Zhang et al. (2003b). Авторы продемонстрировали иммуносупрессивное действие фукоидана из *L. japonica*, ингибирующего образование IgG и IgM антител, а также С3 и С4 компонентов комплемента. Такие полисахариды могут стать основой для создания лекарственных препаратов, которые можно будет применять при хронических воспалительных процессах.

Наши исследования (Запорожец, 2006; Запорожец, Беседнова, 2007), касающиеся действия фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* на гуморальный ответ, решали два вопроса: как этот полисахарид влияет на синтез антител и как при этом изменяется активность клеточных эле-

ментов, участвующих в антителообразовании. С этой целью мы провели изучение количества антителообразующих клеток (АОК) в суспензиях клеток селезенки, а также гемолизинов и гемагглютининов в сыворотке крови мышей после иммунизации гетерологичным тимусзависимым корпускулярным антигеном — ЭБ.

Анализ кинетики сывороточных антител показал, что парентеральное введение исследуемых биополимеров мышам, иммунизированным ЭБ (за сутки до иммунизации), приводит к усилению иммунной реакции, выражающемуся в умеренном повышении титров IgM-антител. Титр гемагглютининов и гемолизинов превышал контрольные показатели в 1,2 раза. Исследование клеточных элементов, участвующих в образовании антител, позволило установить, что через 4 дня после внутрибрюшинной инъекции 5×10^7 ЭБ в селезенке мышей F1(C₅₇BlxСВА) накапливалось 860 ± 101 (контроль - 478 ± 65) АОК при введении полисахарида в индуктивную фазу антителообразования и 749 ± 86 (контроль 478 ± 65) АОК, секретирующих IgM-антитела, специфические к тимусзависимому антигену — эритроцитам барана. Анализ результатов парентерального введения биополимеров морских гидробионтов как в индуктивную (за сутки до иммунизации животных ЭБ), так и в продуктивную (через 3 дня после иммунизации мышей ЭБ) фазы антителогенеза выявил усиление иммунной реакции на антиген: в селезенке мышей наблюдалось статистически значимое увеличение как относительного (в пересчете на 10^6 ядродержащих клеток), так и абсолютного числа клеток, синтезирующих IgM-антитела.

При исследовании зависимости эффекта от дозы фукоидана был установлен достаточно широкий интервал эффективных доз — от 10 мг/кг до 25 мг/кг.

В серии экспериментов по изучению субпопуляционного состава клеток селезенки мышей F₁(СВАхС₅₇ВL) после внутрибрюшинного введения фукоидана в дозе 5 мг/кг установлено увеличение относительного содержания и абсолютного количества В-лимфоцитов, идентифицируемых в комплементзависимом цитотоксическом тесте по выявлению на поверхности клеток МВLА (мышинного В-лимфоцитарного антигена).

Максимальное увеличение количества В-лимфоцитов регистрировалось на 3 сутки после введения ПС. Уровень В-лимфоцитов возвращался к исходным показателям к концу 2-й недели.

Для оценки влияния фукоидана на гуморальный ответ при разных способах введения использовали пероральное и парентеральное введение полисахарида.

Парентеральное однократное введение фукоидана в оптимальной дозе 5 мг/кг как в индуктивную, так и в продуктивную фазу антителогенеза,

приводило к статистически значимому увеличению абсолютного количества АОК в селезенке мышей (ИС составлял 1,69, $p=0,004$ и 1,48, $p=0,008$ соответственно), а также титров ГА (ИС составил 1,20 при $p=0,004$) и ГЛ (ИС=1,32 при $p=0,005$) в сыворотке крови мышей-гибридов F₁(СВАхС₅₇ВL), иммунизированных ЭБ. Пероральное введение фукоидана в течение двух недель также значимо стимулировало формирование АОК в селезенке (ИС=1,27, $p=0,000$) и ГЛ (ИС=1,3, $p=0,000$) в сыворотке крови.

Поскольку фукоидан обладает антикоагулянтным действием, интенсивность гуморального иммунного ответа на ЭБ у мышей была изучена в сравнении с известным препаратом аналогичного действия — гепарином (Кузнецова, 2009). В этой серии экспериментов гуморальный иммунный ответ исследовали как описано выше — по значениям титров ГЛ и ГА, а также по числу АОК в селезенке мышей при введении гепарина и фукоидана за 1 сутки до иммунизации эритроцитами барана (в индуктивную фазу антителогенеза). Было установлено стимулирующее влияние фукоидана при его введении как в оптимальной (5 мг/кг), так и в высокой (100 мг/кг) дозах на показатели антителогенеза (различия с контролем статистически значимы). Под влиянием гепарина в дозе 5 мг/кг также отмечалось увеличение числа АОК в селезенке животных, сопоставимое с таковым под влиянием фукоидана в такой же дозе (39652 ± 2361) и 41903 ± 3621 соответственно). Однако при введении гепарина в высокой дозе (100 мг/кг) наблюдалось угнетение по сравнению с контролем гуморального ответа на ЭБ, регистрируемое как по числу АОК в селезенке (10516 ± 861 против 32322 ± 2298 в контроле, $p=0,000$), так и по титрам ГА ($5,22 \pm 0,24 \log_2$, против $7,69 \pm 0,61 \log_2$ в контроле, $p=0,01$) и ГЛ ($3,8 \pm 0,34 \log_2$ против $5,1 \pm 0,33 \log_2$ в контроле, $p=0,02$).

Усиление пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, регистрируемое по увеличению числа АОК в селезенке при введении фукоиданов в индуктивную фазу антителообразования, может быть обусловлено влиянием на любые из процессов, в течение которых В-лимфоцит получает специфический антигенный сигнал, распознаваемый антигенспецифическими рецепторами, и ряд дополнительных сигналов от клеток помощников, запускающих процесс активации и выводящих лимфоциты из фазы покоя G₀ в пресинтетическую фазу клеточного цикла G₁. Свой вклад в обеспечение различных этапов активации и последующего развития В-лимфоцитов вносят и цитокины, продукция которых усиливается при действии фукоидана. Так, активацию покоящихся В-лимфоцитов наряду с антигеном могут усиливать IL-4 и IL-1. Эти цитокины еще более эффективно влияют на активированные В-лимфоциты, на которые несколько позже действуют также IL-2 и TNF α .

Клеточные факторы адаптивного иммунитета

Сульфатированные полисахариды стимулируют не только гуморальный, но и клеточный адаптивный иммунитет (Ko et al., 2009; Myers et al., 2011). Усиление клеточного иммунного ответа под влиянием фукоиданов лежит в основе их противоопухолевой активности и является одним из механизмов антиметастатического действия (Itoh et al., 1993; Choi et al., 2005).

Под действием фукоидана, выделенного из водоросли *F. vesiculosus*, наблюдалась стимуляция пролиферации спленоцитов, при этом цитометрический анализ показал увеличение их размеров по сравнению с контролем. Увеличивалась выживаемость этих клеток. Спленоциты, обработанные фукоиданом, характеризовались повышенной экспрессией CD25, альфа-цепи рецептора IL-2, который является маркером активации лимфоцитов (Ko et al., 2009). Эти факты свидетельствовали об иммуностимулирующем эффекте фукоидана и, прежде всего его действии на клеточный иммунитет.

Однако, есть сведения и об иммуносупрессивном эффекте фукоидана в отношении клеточных факторов адаптивного иммунитета (Zhang et al., 2003b). Так, фукоидан из *L. japonica* снижал интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа, индуцированной 2,4-дихлорбензолом при пероральном введении в дозах 150 и 300 мг/кг за 9 дней до введения гаптена. Близкие результаты получены (Ishihara et al., 2005). Использование *per os* порфирана — сульфатированного полисахарида, состоящего из галактозы и 3,6-ангидрогалактозы, в количестве 2% в питьевой воде супрессировало ГЗТ (модель отека уха), обусловленную, как и в предыдущей работе, 2,4,6-тринитробензолом. Одновременно снижался уровень IgE в сыворотке крови животных и IFN γ в жидкости из мочки уха.

В наших исследованиях, (Запорожец, 2006; Кузнецова, 2009) влияние фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* на клеточный иммунный ответ оценивали в двух модельных системах: *in vitro* — по изменению пролиферации лимфоцитов в реакции бласттрансформации лимфоцитов (спонтанной и индуцированной митогенами) и *in vivo* — в реакции гиперчувствительности замедленного типа (как на стадии сенсибилизации, так и разрешения).

Влияние фукоидана на спонтанную и индуцированную митогеном пролиферацию лимфоцитов

Фукоидан вносили в дозе 1, 10, 100 мкг/мл в лунки планшетов, содержащих суспензию лимфоцитов периферической крови доноров (оценка влияния на спонтанную пролиферацию) или суспензию лимфоцитов периферической крови доноров и митоген (ФГА в дозе 1 или 10 мкг/

мл) — оценка влияния на митогениндуцированную пролиферацию лимфоцитов. Было установлено, что выраженность и направленность модулирующего эффекта зависела от внутренних потенций клеток (покой или активация). В предварительных исследованиях было установлено модулирующее влияние фукоидана на способность лимфоцитов к бласттрансформации в зависимости от степени «пролиферативного потенциала»: при исходно низкой спонтанной пролиферации фукоидан в оптимальной дозе (10 мкг/мл) проявлял стимулирующее действие, при высокой — ингибировал пролиферацию.

В следующей серии экспериментов для выявления зависимости пролиферации лимфоцитов от дозы фукоидана использовали культуры клеток с низкой или средней пролиферативной активностью (спонтанная пролиферация от 8500 до 11600 имп/мин). Как следует из материалов таблицы 9.1, фукоидан обладал митогенной активностью. Установлены статистически значимые различия между уровнем включения ^3H -тимидина и дозами фукоидана.

Таблица 9.1

Влияние фукоидана на спонтанную и митогениндуцированную пролиферацию ЛПК *in vitro*

Вариант опыта	Доза, мг/мл	Включение ^3H -тимидина, имп/мин					
		Митоген-индуцированная пролиферация (M \pm m)	p*	ИС	Спонтанная пролиферация (M \pm m)	p	ИС
Контроль	—	—	0,000	1,5	1634 \pm 173	0,13	1,3
ФГА	1	11193 \pm 950	0,006	1,1	—	0,06	1,7
Фукоидан	10	16229 \pm 1003	0,19	0,8	2124 \pm 224	0,003	2,0
	100	12213 \pm 876	0,008		2778 \pm 276		
		7552 \pm 591			3300 \pm 292		
		p**=0,000			p**=0,000		

Примечание: ИС — индекс стимуляции — рассчитан как отношение среднего значения пролиферации в импульсах в минуту в опытных и контрольных культурах; (p*) — значимость различий по сравнению с ФГА, (p) — значимость различий по сравнению с контрольными показателями (интактные клетки); p** — значимость различий по результатам дисперсионного анализа; n=9.

Усиление пролиферации Т-лимфоцитов было подтверждено в экспериментах по изучению субпопуляционного состава клеток селезенки

мышей F1 (CBAxС57BL) после внутрибрюшинного введения фукоидана в дозе 5 мг/кг (идентификация Т-лимфоцитов по выявлению на поверхности клеток MTLA (мышинного Т-лимфоцитарного антигена в комплементзависимом цитотоксическом тесте (Запорожец, 2006)). Увеличение относительного содержания и абсолютного количества Т-лимфоцитов наблюдалось при введении полисахарида уже через 48 часов после инъекции биополимера, достигало максимума на 5–7 сутки и возвращалось к исходному уровню на 12-й день (5-е сутки — 156% от контроля, $p=0,008$).

Таким образом, доза полисахарида, исходное состояние клетки и ее внутренний потенциал являются решающими в реализации эффекторной реакции и определяют ее направление. Стимуляция пролиферативного ответа фукоиданом при использовании субоптимальной дозы митогена может быть обусловлена суммацией митогенных сигналов ФГА и фукоидана.

Влияние фукоидана из водоросли *F. evanesceps* на интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа

Оценку влияния фукоидана на интенсивность РГЗТ проводили как на стадии сенсibilизации, так и на стадии разрешения. С этой целью различные дозы фукоидана вводили одновременно с сенсibilизирующей и разрешающей дозой антигена. По результатам реакции судили о влиянии полисахарида на различные стадии клеточного иммунного ответа: в первом случае — на процесс образования клона антигенспецифических Т-лимфоцитов, во втором случае — на способность этих лимфоцитов при встрече с антигеном продуцировать провоспалительные цитокины.

Фукоидан оказывал разнонаправленное действие на РГЗТ, зависящее от дозы и сроков введения относительно тест-антигена. Полисахарид увеличивал интенсивность реакции при введении как перед сенсibilизирующей, так и перед разрешающей дозами ЭБ с максимальным эффектом при использовании в дозе 5 мг/кг при введении с целью сенсibilизации (процент прироста массы лапы $34,6 \pm 7,7$, $p=0,02$ и $14,6 \pm 1,5$, $p=0,001$, в контрольной группе — $14,6 \pm 1,5$ и $7,8 \pm 0,9$ соответственно). Индекс стимуляции составил 1,7–1,9 в зависимости от срока введения и используемой дозы.

При пероральном введении фукоидана в дозе 50 мг/кг также отмечалось статистически значимое усиление интенсивности РГЗТ к ЭБ (ИС составил 1,37, $p=0,009$) (Кузнецова, 2009).

Усиление ГЗТ, наблюдаемое при введении фукоидана, может быть связано с его способностью активировать макрофаги, повышать экспрессию на Т-лимфоцитах молекул МНС II, стимулировать пролиферацию антигенспецифических Т-лимфоцитов и увеличивать секрецию провоспалительных цитокинов, обеспечивающих развитие реакции.

Молекулярные механизмы активации лимфоцитов

Молекулярный механизм передачи трансмембранного сигнала с поверхности внутрь клетки является ключевым вопросом в исследовании активации лимфоцитов. Начальные стадии активационного процесса выражаются в запуске каскадных механизмов, формирующих цепную реакцию биохимических механизмов функционального ответа. Одним из посредников передачи сигнала являются кальцийзависимые процессы, входящие в универсальную иерархическую систему вторичных посредников, центральное место в которой занимают циклические нуклеотиды (ЦН) - аденозин-3'-5'-монофосфат (цАМФ) и гуанозин-3'-5'-монофосфат (цГМФ) (Ярилин, 1999).

Для объяснения механизмов активации лимфоцитов исследуемыми биополимерами было изучено их влияние на изменение концентрации внутриклеточного (Ca^{2+})_i, цАМФ, цГМФ, а также экспрессию мембранно-ассоциированных иммунорегуляторных структур.

Было установлено, что уже через несколько секунд после добавления фукоидана к монослою лимфоцитов периферической крови уровень внутриклеточной концентрации кальция (Ca^{2+})_i превышал базальный в 6–8 раз, через 10–20 секунд возвращаясь к исходному состоянию.

Недавно наши результаты были подтверждены Е.В. Соколовой (2012), которая работала с каррагинанами — СПС, полученными из красных водорослей.

Увеличение концентрации внутриклеточного (Ca^{2+})_i и цГМФ в иммунокомпетентных клетках доказывают участие фукоидана в модификации ключевых сигналпередающих систем клеток, формирующих цепную реакцию биохимических механизмов функционального ответа. Следствием стимуляции триггерных процессов может являться переход лимфоцитов из фазы покоя G₀ в G₁-фазу клеточного цикла, которую можно проследить по экспрессии — рецепторов к ИЛ-2 (CD25), трансферрину (CD71), HLA-DR.

Мы установили, что культивирование ЛПК в присутствии фукоидана в конечной концентрации 100 мкг/мл приводит к увеличению экспрессии активационных антигенов — как ранних — CD25 и CD71, так и позднего — HLA-DR.

Общий характер модуляции экспрессии ключевых иммунорегуляторных мембранно-ассоциированных структур, с которыми может быть связана функциональная активность фармакологически индуцированных клеток-регуляторов иммуногенеза (CD3, CD4, CD8-молекул) ЛПК здоровых доноров под воздействием фукоидана отражал общие закономерности и зависел от исходного состояния отвечающих клеток: полисахарид не влиял на уровень экспрессии CD-маркеров, если они были в норме,

увеличивал, если их уровень был ниже средних значений и снижал до уровня нормы, если их значения были выше средне нормальных.

Факт усиления экспрессии CD-молекул имеет большое значение, поскольку клетки с повышенной экспрессией мембранноассоциированных структур, опосредующих прямые межклеточные взаимодействия в первые часы после активации, могут способствовать дополнительной активации взаимодействующих клеток, проявляя тем самым свою функциональную активность как клеток-регуляторов.

Механизм действия фукоидана на начальных этапах процесса образования CD-молекул лимфоцитов был изучен нами с помощью ингибитора ДНК-зависимого синтеза РНК актиномицина Д, который блокирует работу РНК-полимеразы, встраиваясь в ДНК, что в конечном итоге приводит к прекращению синтеза белка и снижению экспрессии исследуемых молекул на мембране клетки. Внесение в среду культивирования трипсинизированных лимфоцитов актиномицина Д приводило к прекращению синтеза мембраноассоциированных структур с последующим восстановлением без какого-либо внешнего влияния и усиливалось под действием фукоидана. Снижение уровня экспрессии мембраноассоциированных структур на клетках с ингибированным метаболизмом является следствием нарушения транскрипционных механизмов, а восстановление CD-молекул под действием исследуемых биополимеров демонстрирует зависимость этого процесса от ДНК-зависимого синтеза РНК.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о том, что фукоидан оказывает свое действие на мембранном уровне, модулируя активность ключевых систем сигнальной трансдукции, изменяет течение ранних этапов активации иммунокомпетентных клеток, обеспечивающих последующие стадии развития функционального ответа клеток. Фукоидан обладает способностью увеличивать внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} в лимфоцитах крови человека. Очевидно, что следствием активации молекул сигнальной трансдукции фукоиданом является усиление экспрессии ключевых иммунорегуляторных мембраноассоциированных структур, с которыми может быть связана функциональная активность фармакологически индуцированных клеток-регуляторов иммуногенеза. Механизм индукции экспрессии мембраноассоциированных структур фукоиданом сопряжен с процессами транскрипционной регуляции синтеза ДНК.

Глава 10. Противовоспалительные эффекты сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей

Высокий уровень и социальная значимость острых и хронических воспалительных заболеваний требует разработки новых безопасных и эффективных противовоспалительных препаратов.

Воспаление представляет собой адаптивный поливалентный динамичный процесс с множеством альтернативных и перекрещивающихся путей как на уровне внутриклеточных сигнальных каскадов, так и на уровне продукции медиаторов воспаления. Характер воспалительного процесса зависит от транскрипционных факторов. Они участвуют в регуляции клеточных генов, продукты которых необходимы для воспаления. Это цитокины (в том числе хемокины), клеточные адгезины, простагоиды, факторы, контролирующие апоптоз, дифференцировку и пролиферацию клеток; антигенпредставляющие молекулы. Главную роль в этих процессах играет ядерный фактор — NF- κ B, отвечающий за адаптивные реакции клеток. Активацию NF- κ B вызывают физические и химические факторы, инфекционные агенты и их дериваты, сигнальные молекулы (гормоны, цитокины, ростовые факторы, цАМФ и др.). NF- κ B влияет на различные гены, участвующие в иммунном, острофазовом и воспалительном ответах. Сюда относятся гены IL-1 β , TNF α , IL-2, IL-6, IL-12, IL-8 и других хемокинов, индуцибельных ферментов (iNOS, COX-2), молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1, E-селектин), главного комплекса гистосовместимости (MHC-I и MHC-II), белков комплемента (B, C3, C4), факторов, контролирующих клеточный цикл (p53, циклин D1 и др.), ингибиторов и активаторов апоптоза (cIAP-1, cIAP-2, FasL, Bcl-2, TRAF-1, TRAF-2 и др.). Активация NF- κ B обычно задерживает апоптоз, продлевая жизнь клеток-эффекторов в очаге воспаления.

Многообразие медиаторных путей, возбуждающих NF- κ B, создает спектр мишеней для искусственной регуляции иммунных и воспалительных реакций. Главным из них является NF- κ B и его ключевые регуляторы I κ B и IKK. Транслокация NF- κ B в ядро блокируется ингибиторами окислительного стресса — дитиокарбаматом пирролидина и глиотоксином (препарат из аспергилл) (Tak, Firstein, 2001; Krakauer, 2004). Ингибиторами I κ B (белок, с которым в цитоплазме клетки связан NF- κ B) служат факторы, подавляющие серин-фосфорилирование, убиквитинизацию и протеасомный протеолиз (Yamamoto, Gainnor, 2001). Все они блокируют инактивацию I κ B, сохраняя его комплексообразующие функции с NF- κ B. Похожее действие оказывают блокаторы IKK. Таким

образом, воздействовать на воспалительный процесс возможно путем ингибирования NF-κB (Yamamoto, Gainor, 2001).

Противовоспалительными свойствами обладают ингибиторы деструктивной функции протеасом (Neish et al., 2000; Klumpp et al., 2001). Так ведут себя пептиды из группы борной кислоты (Adams et al., 1999; Elliott et al., 2003). Ингибцию NF-κB могут вызывать и естественные продукты, например, куркумин (Singh, Aggarwal., 1995). Это вещество, используемое в качестве противовоспалительного средства, подавляет разрушение NF-κB, блокируя медиаторные пути, ведущие к активации IKK (Jobin et al., 1999), связанные с эпителиальными клетками (Petrof et al., 2004). TNF-индуцированный апоптоз колоноцитов подавляют лактобациллы и их дериваты (Yan, Polk, 2002). Последнее обстоятельство открывает перспективы использования этих данных в лечебных и профилактических целях (Маянский и др., 2007).

Быстрый антипротеасомный эффект интестинальных эпителиоцитов вызывают лактобациллы, которые выделяют специальные факторы, подавляющие активацию NF-κB, блокируя воспалительные реакции в кишечнике.

В связи с этим большой интерес в качестве модуляторов воспалительного процесса представляют сульфатированные полисахариды (СПС) из бурых и красных морских водорослей, обладающие способностью регулировать функциональную активность многих молекул, участвующих в воспалительном процессе, и тем самым влиять на течение и исход как острых, так и хронических воспалительных процессов (Ishihara et al., 2005; Jiao et al., 2011).

Противовоспалительные свойства морских водорослей доказаны тысячелетней историей применения и научно обоснованы фундаментальными исследованиями. Фармакологическая активность получаемых из них нетоксичных СПС обусловлена их способностью воздействовать комплексно сразу на несколько систем организма (Chung et al., 2010; Mohamed et al., 2012). Кроме того, на их основе возможно получение производных с более высокой или новой биологической активностью (Усов, Билан, 2009; Cumashi et al., 2007; d'Ayala et al., 2008).

Проникновение в организм чужеродных антигенов сопровождается активацией нейтрофилов и быстрым выходом этих клеток из сосудистого русла по направлению к очагу воспаления или инфицированным тканям, что является ключевым этапом в системе защиты организма при внедрении патогенов. Однако при патологических процессах, сопровождающихся гиперпродукцией провоспалительных молекул (цитокинов, комплемента, IgE-антител и пр.), миграция лейкоцитов в очаг воспаления лишь утяжеляет клиническую картину болезни. Ключевую роль в этом процессе играют селектины — семейство адгезивных рецепторов, экспрес-

сирующихся на эндотелиальных клетках (P- и E-селектины), тромбоцитах (P-селектин) и лейкоцитах (L-селектин). Одной из основных функций селектинов является осуществление адгезивного взаимодействия лейкоцитов с клетками эндотелия в процессе экстравазации лейкоцитов из кровяного русла в область воспаления. Противовоспалительные свойства фукоиданов проявляются в этом случае в их способности препятствовать связыванию лейкоцитов с эпителием сосудов путем замещения углеводных лигандов природных рецепторов L- и P-селектинов, тем самым предотвращая миграцию лейкоцитов в очаг воспаления (Бовин и др., 1998; Shimaoka et al., 1996; Teixeira, Hellewell, 1997; Zhang et al., 2001; Matsui et al., 2003; Senni et al., 2006; Wang et al., 2006; Margret et al., 2009; Siqueira et al., 2011;). Изучение лигандной специфичности селектинов-опосредованного взаимодействия клеток при воспалении открывает пути к созданию противовоспалительных лекарственных препаратов нового поколения, действующих по принципу ингибирования клеточной адгезии. К таким веществам можно отнести и СПС из морских водорослей. Ряд работ, посвященных этому вопросу, был опубликован еще в 90-х годах прошлого века. Так, при внутривенном введении фукоидана крысам с экспериментальным P-селектинзависимым перитонитом, вызванным введением пептона, наблюдалось значительное подавление выхода нейтрофилов в брюшную полость (Бовин и др., 1998). Авторы объясняют блокирование воспаления на ранних стадиях развития воспаления взаимодействием полисахарида с P-селектином. Наилучший результат был получен в первые 15 мин после введения пептона; через 2,5 часа ингибирование хемотаксиса уже не наблюдалось. Эффект при этом был дозозависимым.

Н.А. Ушакова и соавт. (1999) разработали модель асептического острого воспаления (перитонита) у крыс, с помощью которой авторы исследовали действие фукоидана и ряда синтезированных аналогов природных лигандов селектинов на ингибирование воспалительного процесса. Значительное подавление выхода нейтрофилов в брюшную полость крыс с экспериментальным P-селектинзависимым перитонитом, вызванным введением пептона, показано при внутривенном введении фукоидана (Семенов и др., 1999).

В работе (Marques et al., 2012) на модели острого перитонита показано выраженное противовоспалительное действие гетерофукана, полученного из водоросли *Padina gymnospora*, не содержащего альгиновых кислот. Полисахарид был выделен путем экстракции ацетоном и очищен на сефадексе G-75. Молекулярная масса биополимера составляла 25.000 Да. Введение гетерофукана подавляло приток лейкоцитов в брюшную полость мышей на 60% при введении полисахарида в дозе 10 мг/кг массы тела и на 39% — при использовании гетерофукана в дозе 25 мг/кг. Гете-

рофукан был нетоксичен. Авторы отметили интересный факт: высокие концентрации полисахарида (выше 375 мкг/мл) снижали продукцию макрофагами оксида азота, а низкие, наоборот, повышали. Последнее обстоятельство еще раз доказывает необходимость осторожного подхода к использованию СПС в качестве основы для получения лекарств, БАД и продуктов функционального питания.

Противовоспалительный эффект фукоидана при ежедневном внутривенном введении мышам с экспериментальным колитом выявлен также X.W. Zhang et al. (2001).

Известно, что молекулы адгезии, которые экспрессированы на поверхности клеток, участвуют в воспалительном процессе. N.S. Kang et al. (2011) исследовали действие высокомолекулярного фукоидана на экспрессию адгезионной молекулы ICAM-1, вызванное введением провоспалительных цитокинов — $\text{fnTNF}\alpha$ — комплекса $\text{IFN}\gamma$ и $\text{TNF}\alpha$ — на клетках SH-SY-5Y (клетки нейробластомы человека). В этом случае было установлено ингибирование образования NO и экспрессии ICAM-1. В мутантных клетках SH-SY-5Y с отсутствием гена p53 экспрессии ICAM-1 под действием провоспалительных цитокинов не было. Это наблюдение позволило авторам заключить, что экспрессия ICAM-1, индуцированная цитокинами, при обработке клеток фукоиданом снижается через p53 независимый путь.

Антиадгезивная активность фукоидана, полученного из водоросли *Spatoglossum Schroederi* (Rocha et al., 2005a), была установлена на двух линиях клеток CHO-1 (клетки яичника китайского хомячка) и CHO-745 (мутантный тип клеток, дефицитных по ксилосилтрансферазе). Субстратом для клеточной адгезии служил фибронектин. Антиадгезивный дозозависимый эффект наблюдался на обоих видах клеток. Десульфатирование фукана отменяло эффект ингибирования адгезии. Применение конфокальной микроскопии и цитометрического анализа позволило определить, что фукан проявляет антиадгезивную активность при прямом связывании с фибронектином.

Сравнительное изучение противовоспалительной активности группы фукоиданов из разных видов водорослей позволило обнаружить наиболее высокую активность у фукоидана из бурой водоросли *L. saccharina* (Устюжанина и др., 2002). С целью установления структурных особенностей этого фукоидана, определяющих его активность, была синтезирована серия из семи олигосахаридов — фрагментов его молекулы. Наиболее активным блокатором воспаления оказался дифукозид, содержащий пять сульфатных групп. Подавление хемотаксиса лейкоцитов в перитонеальную полость крыс с экспериментальным перитонитом наблюдали также A. Cumashi et al. (2007). При этом авторы установили, что способ-

ность фукоидана блокировать P-селектин-опосредованное воспаление зависит от структуры полисахаридных цепей. Так, фукоидан из водоросли *S. okamuranus*, имеющий специфическую структуру 2-O-L-D - глюкоуронил, в меньшей степени оказывал противовоспалительный эффект по сравнению с фукоиданами, не имеющими такой структуры.

Антивоспалительный эффект СПС из водоросли *Padina tetrastomatica* наблюдали (Sulaiman et al., 2011) на модели отека лап крыс, вызванного введением каррагинана. При этом СПС снижал концентрацию в крови циклоксигеназы и липоксигеназы, а также церулоплазмину и миелопероксидазы в сыворотке крови и отечной ткани. Таким образом/, окислительный стресс, обусловленный каррагинаном, купировался введением СПС из водоросли.

Установлена также способность фукоидана блокировать адгезию нейтрофилов на эпителиальных клетках кишечника, связываясь с CD11b/CD18. Ингибирование миграции лейкоцитов к стандартному хемоаттрактанту и частичная блокада адгезии нейтрофилов к эндотелиальным клеткам полисахаридом, выделенным из красных микроводорослей, описана M.S. Matsui et al. (2003). В других экспериментах (Senni et al., 2006) блокада хемотаксиса нейтрофилов в брюшную полость животных сопровождалась подавлением активности тканевых энзимов — гепараназы и эластазы.

Достаточно много исследований, посвященных снижению или блокированию хемотаксиса нейтрофилов с помощью СПС, проведено с использованием моделей экспериментального артрита, а также субплантарного отека (Cardoso et al., 2010; Mhathebi et al., 2011). Так, M.L. Cardoso et al. (2010) сообщают о противовоспалительном действии фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* и его фракций на интенсивность воспаления коленного сустава крыс, обусловленного введением зимозана. У животных, получивших фукоидан, значительно снижался приток лейкоцитов в очаг воспаления. Такие же результаты, только с коллаген-индуцированным артритом, отмечены и другими авторами (Park et al., 2010). При этом фукоидан с низкой молекулярной массой значительно интенсивнее снижал тяжесть течения артрита, подавлял приток нейтрофилов в очаг воспаления и уровень Th1-зависимых коллаген-специфических IgG по сравнению с высокомолекулярным аналогом.

Фукан из бурой морской водоросли *Lobophora variegata* ингибировал отек лапы крыс Vistar, индуцированный зимозаном, проницаемость сосудов, миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, а также снижал уровень NO в экссудате перитонеальной полости животных (Siqueira et al., 2011). Механизмы этого явления авторы объясняют ингибированием экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и циклоксигеназы-2 (COX-2), уровень которых при воспалении значительно повышался.

Противовоспалительный эффект (уменьшение субплантарного отека на 80% при введении каррагинана) был характерен и для экстрактов водорослей, например, метанольного экстракта, полученного из зеленой водоросли *Ulva latuca* (Margret et al., 2009). В этих экспериментах в качестве препарата сравнения был использован аспирин, применение которого уменьшало отек только на 60%. Одним из механизмов противовоспалительного действия фукоидана было значительное подавление продукции медиаторов воспаления — гистамина, серотонина и PGE2. При гистологическом исследовании установлено образование некротических очагов в тканях миокарда, печени и почек у животных контрольных групп (не получавших экстракт и получавших вместо экстракта аспирин). У крыс, получавших экстракт водоросли *Ulva latuca*, некротические очаги отсутствовали.

Водные и экстракты, полученные органическими растворителями водоросли другого вида *Dictiopteris membranaceae* проявили противовоспалительное действие на модели субплантарного отека лапы крыс, обусловленного введением каррагинана. Эффект был дозозависимым. Экстракт водоросли через 3 часа после введения уменьшал отек на 65% при использовании дозы 100 мг/кг⁻¹ и на 51% — при введении экстракта в дозе 50 мг/кг⁻¹.

Экстракт водоросли *Sargassum fulvellum* на 79% подавлял приток нейтрофилов в воспалительный очаг (экспериментальный отек тканей уха), индуцированный форбол-миристан-ацетатом (Kang et al., 2008) у мышей. S.P. Myers et al. (2010) показали эффект применения питательного комплекса (Maritech), состоящего из экстрактов трех видов водорослей (*F. vesiculosus*, *Macrocystis pyrifera* и *L. japonica*) при остеоартрите у людей, сопоставимый с действием нестероидных препаратов (снижение выраженности симптомов в среднем на 50%). Все экстракты были нетоксичными для мышей в дозе 5 г/кг массы тела.

Фукоидан был использован в качестве новой стратегии лечения экспериментального бактериального менингита у крыс, ранняя фаза которого характеризуется проникновением лейкоцитов в субарахноидальное пространство и цереброспинальную жидкость. Фукоидан уменьшал симптомы воспаления, заметно снижая количество лейкоцитов в ликворе. Авторы отмечают перспективность использования фукоидана в качестве дополнительного средства, блокирующего селектины в ранней фазе менингеальной инфекции (Granert et al., 1994, 1999).

Приведенные материалы свидетельствуют о том, что взаимодействие фукоидана с селектинами на клеточной поверхности эндотелия сосудов является механизмом противовоспалительного действия этого биополимера.

Важнейшим элементом врожденного иммунитета, принимающим

активное участие в воспалительном процессе, являются макрофаги. Действие СПС на функциональную активность этих клеток далеко неоднозначно. Значительное число работ, в том числе и наших, содержат сведения об усилении функциональной активности этих клеток под действием СПС (см. главу 14) (Запорожец, 2006; Запорожец, Беседнова, 2007; Ермак и др., 2009; Hwang et al., 2011). Активация макрофагов фукоиданами происходит при связывании молекулы полисахарида с распознающими «рецепторами-мусорщиками», специфичными для этих полисахаридов (Mytar et al., 2004). Приводится много доказательств активации макрофагов под действием СПС, в частности, усиление их способности к спонтанной продукции кислородных радикалов (Запорожец, 2006; Hwang et al., 2010), стойкое и длительное снижение уровня 5'-нуклеотидазы (Запорожец, Беседнова, 2007), повышение экспрессии генов iNOS-2 и COX-2 и увеличение продукции NO, PGE-2, а также провоспалительных цитокинов (Leiro et al., 2007).

С другой стороны, многие исследователи наблюдали оппозитные эффекты СПС на функциональную активность макрофагов, свидетельствующие об их противовоспалительном потенциале. Так, показан ингибирующий эффект фукоидана на процесс активации клеток микроглии — специализированного класса глиальных клеток центральной нервной системы, фагоцитов мезодермального происхождения, уничтожающих инфекционные агенты (Cui et al., 2010). В культуре под действием ЛПС эти клеточные элементы выделяют большое количество NO и H₂O₂. Чрезмерная активация микроглии этими веществами может приводить к возникновению патологических процессов, в частности, к гибели нейронов, что является одним из патологических механизмов болезней Паркинсона, Альцгеймера, деменции, вызванной ВИЧ и др.

С целью определения действия фукоидана на процесс активации клеток микроглии культуру этих клеток обрабатывали разными дозами фукоидана, после чего подвергали воздействию липополисахарида. Исследовали уровень продукции NO, митогенактивированной протеинкиназы и морфологию клеток микроглии. Липополисахарид обуславливал изменение морфологии клеток, — они приобретали амёбовидную форму, в то время как обработка клеток фукоиданом препятствовала такой активации. Продукция NO снижалась на 75%, экспрессия mRNA и белка — на 50%. Фукоидан также подавлял фосфорилирование p38 и ERK, но не ингибировал c-Jun N-терминальную киназу. В микроглии, активированной ЛПС, был исследован механизм ингибирующего эффекта фукоидана на образование NO, включая дисрегуляцию активации MAPK. Липополисахарид активировал все три пути MAPK в микроглии.

Было установлено, что фукоидан подавляет фосфорилирование p38 и ERK, но не JNK. Следовательно, ингибиторный эффект фукоидана на продукцию NO и экспрессию индуцибельной iNOS в обработанных ЛПС клетках микроглии связан с супрессией фосфорилирования ERK и p38.

О снижении экспрессии индуцибельной iNOS и подавлении синтеза NO в макрофагах линии RAW264.7, стимулированных ЛПС, сообщают также J.W. Yang et al. (2006). Фукоидан избирательно супрессирует AP-1, являющийся, наряду с ядерным фактором NF- κ B, основным элементом в активации транскрипции iNOS-гена, что ассоциируется с противовоспалительной активностью этого биополимера.

В другом исследовании (Park et al., 2011a) на такой же модели было установлено, что фукоидан, полученный из бурой водоросли *F. evanescens*, ингибировал избыточную продукцию NO и PGE2 в клетках микроглии, стимулированной ЛПС, уменьшал экспрессию iNOS, COX-2, хемоаттрактанта моноцитов (MCP-1) и провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α . По мнению авторов этот фукоидан обладал существенным потенциалом для лечения в дальнейшем нейродегенеративных заболеваний.

Подобные результаты были получены P.-A. Hwang et al. (2011) при изучении экстракта, выделенного из водоросли *Sargassum hemiphillum*, содержащего сульфатированный полисахарид и издавна используемого в китайской народной медицине в качестве противовоспалительного средства. В качестве модельной системы была использована клеточная линия макрофагов (RAW 264.7), активированная ЛПС. Экстракт оказывал ингибирующее действие на продукцию NO, а также на синтез провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, TNF α . В ядре и цитозоле клеток обнаруживался NF- κ B (p65). По мнению авторов, противовоспалительные свойства фукоидана могут быть связаны с регулирующей ролью NF- κ B, в результате его транслокации в ядра клеток.

Ацетилированный фукоидан CAF, полученный из культуры водоросли *Cladosiphon ocaturanus*, индуцировал продукцию NO, TNF α и IL-6 в макрофагах мышей клеточной линии RAW 264.7. При этом была прослежена связь между наличием сульфатных и ацетильных групп в фукоидане и продукцией NO. Связывание моноклональными антителами TLR4, CD14 и рецепторов-мусорщиков класса A (SPA) снижало индуцированную фукоиданом продукцию оксида азота. Результаты иммуноблот-анализа позволили установить, что CAF активировал MAPKs (митоген-ассоциированные протеинкиназы такие как 38MPK (внеклеточные сигнал-отрегулированные киназы) и SAPK/JNK (стресс-активируемые протеинкиназы или c-JunNH₂ терминальные киназы), играющие важную роль в клеточных реакциях на внешние стрессовые сигналы. CAF-индуцированную

продукцию NO снижали SB203580 (ингибитор p38MAPK) и SP600125 (ингибитор SAPK/JNK). Таким образом, фукоидан активирует макрофаги через мембранные рецепторы TLR4, CD14 и SPA, а также по митогенактивированному протеинкиназному пути.

Синтез провоспалительных цитокинов (IL-6, GM-CSF) и хемокинов (Rantes) снижал фукоидан (сульфатированный глюкозаминогликан) из водоросли *F. evanescens* (Kwak et al., 2010).

Известно, что к отрицательным сторонам действия PGE2 помимо участия в развитии патологического воспаления и аллергических реакций относятся участие в реализации диспластических и неопластических процессов, а именно в подавлении апоптотической клеточной гибели, патологическом неоангиогенезе и инвазии, а также в опосредовании иммуносупрессивных функций. Повышенный уровень COX-2 сопряжен с канцерогенными процессами во многих тканях, в том числе, в предстательной железе (Gupta et al., 2000). В связи с этим вызывает интерес исследование (Kang et al., 2011;), в котором показано, что фукоидан, полученный из водоросли *E. cava*, ингибировал образование ПГЕ-2 и NO путем подавления экспрессии генов iNOS-2 и COX-2 в макрофагах линии RAW264.7, стимулированных ЛПС, а также IFN α в клетках глии (Do et al., 2010). Приведенные данные иллюстрируют еще одну сторону ингибирующего действия СПС на функциональную активность макрофагов.

Mecabu фукоидан (*Sporophyll of Undaria pinnatifida*) описан как селективный ингибитор фосфолипазы, неперенного участника воспалительных процессов (Maruyama et al., 2008). Концентрация этого фермента в плазме крови и тканях коррелирует со степенью развития воспалительного процесса при таких болезнях как септический шок, болезнь Крона, ревматоидный артрит, псориаз, легочные заболевания, астма.

Антикомплементарное действие СПС достаточно подробно освещено в главе Скажем только, что эти биополимеры являются эффективными ингибиторами в большей степени классического пути активации и в меньшей – альтернативного пути активации комплемента и могут использоваться для направленной регуляции активности системы комплемента при воспалительных процессах различного генеза.

Обращают на себя внимание сообщения, касающиеся противоаллергического действия сульфатированных полисахаридов. Так, в работе (Quanbin et al., 2003) показано, что фукоидан из бурой водоросли *L. japonica* подавлял гиперчувствительность к динитрохлорбензолу с одновременным снижением уровня C3 и C4 компонентов комплемента и IgG и IgM в сыворотках крови экспериментальных животных. Похожие результаты получены при использовании порфирана, главного

компонента красных водорослей *Porphyra tenera* и *P. yezoensis* (Ishihara et al., 2005), Снижение уровня сывороточного IgE при внутрибрюшинном введении фукоидана мышам, сенсibilизированным овальбумином, показано (Yanase et al., 2009).

В работе (Iwamoto et al., 2010) установлено, что фукоидан ингибирует продукцию IgE мононуклеарами периферической крови здоровых доноров и пациентов с atopическим дерматитом. В качестве контрольной группы были взяты здоровые лица с высоким уровнем IgE в сыворотках крови. Клетки крови стимулировали IL-4 и анти-CD40- антителами. На 12 день фукоидан снижал экспрессию гена mRNA IgE и его субклассов на В-лимфоцитах пациентов, не изменял уровень продукции IFN γ и повышал образование IL-13. Фукоидан супрессировал продукцию IgE путем переключения синтеза на продукцию других классов антител даже в том случае, если он действовал после начала развития заболевания.

Применение фукоидана с лечебной целью на модели аллергического воспаления легких у мышей способствовало снижению продукции цитокинов, вырабатываемых Th1 (IL-4, IL-5, IL-13) и снижению уровня IgE в сыворотке крови (Maruyama et al., 2005).

Представленные материалы дают основание авторам считать возможным применение сульфатированных полисахаридов в будущем при лечении воспалительных процессов аллергического генеза.

Одним из важных аспектов действия СПС, выделенных из водорослей, является их способность оказывать противовоспалительный эффект на желудочно-кишечный тракт при язвенной болезни колитах и пр. Во-первых, они проявляют антимикробное действие, направленное на ингибирование адгезии патогенов к слизистой, и во-вторых, снижают интенсивность воспалительного процесса, подавляя образование провоспалительных цитокинов, продуцируемых клетками эндотелия слизистых оболочек.

Актуальными в настоящее время являются исследования, касающиеся *Helicobacter pylori*. Этот микроорганизм является одной из причин возникновения язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, а также представляет серьезную проблему в связи с устойчивостью к антибактериальным препаратам, применяемым в лечении этих заболеваний (Locke et al., 2007). Так, установлено, что, например, к кларитромицину нечувствительны 8–30%, а к метронидазолу — 15–66% штаммов *H. pylori*. Более половины населения планеты инфицировано этим микроорганизмом, из них 5–10% имеют гастродуоденальные заболевания (язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, лимфомы и карциномы желудка (Montecusco, Rappuoli, 2001). *H. pylori* считается канцерогеном 1 группы, рак возникает у 1–2% инфицированных. При этом сама бактерия — не

канцероген. Канцерогенным является инфекционный процесс, который инициируется этим возбудителем (Цодиков и др., 2011). В связи с этим в литературе достаточно часто обсуждается вопрос об эрадикации *H. pylori* и снижении интенсивности воспалительного процесса с помощью СПС из разных видов водорослей (Kimura et al., 2000).

В экспериментах *ex vivo* при гастрите, вызванном *H. pylori*, наблюдалось ослабление симптомов болезни при добавлении фукоидана (от 0,05 до 0,5%) в питьевую воду, которую получали животные. Эффективность действия СПС определяет, по-видимому, pH содержимого желудка. Так, фукоидан из бурой водоросли *Cladosiphon ocamuranus* ингибировал прикрепление *H. pylori* к слизистой желудка свиней при pH 2,0 и 4,0, а два других фукоидана, использованных в этих экспериментах, подавляли прикрепление возбудителя только при pH 2,0 (Shibata et al., 2003).

N. Lutau et al. (2011) сравнивали ингибирующую активность гепарина и фукоидана по отношению к адгезии *Helicobacter pullorum* к макрофагам. Оказалось, что фукоидан в этих экспериментах был намного активнее гепарина. При использовании фукоидана адгезия бактерий снижалась на 60–90%, гепарина — на 30–70%. Авторы предлагают использовать фукоидан для профилактики и лечения хеликобактерной инфекции. Аналогичные результаты были представлены в работе L.N. Nilsson et al. (2010), где фукоидан более эффективно, чем гепарин, подавлял адгезию бактерий рода *H. spp* (*H. hepaticus*, *H. pullorum*, *H. bilis*) на мышинных макрофагах клеточной линии O774A.1.

Были проведены и клинические испытания фукоидана при хеликобактерной инфекции у людей. Исследование продолжалось в течение 4-х недель в условиях рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого эксперимента. Под наблюдением находились 60 больных. Результаты показали, что число инфицированных лиц после применения фукоидана снизилось в большей степени в опытной группе по сравнению с группой плацебо. Авторы рекомендуют использовать фукоидан в продуктах функционального и диетического питания (Back et al., 2011).

Таким образом, фукоиданы в перспективе могут использоваться для защиты от инфицирования человека *H. pylori* и в качестве противоязвенного средства, особенно в тех случаях, когда антибактериальное действие не сопровождается антикоагулянтным.

Ингибиторы COX-2 и iNOS были обнаружены в составе экстракта из бурой водоросли *Dictyota dichotoma* (Yoon et al., 2009). Экстракцию проводили водой, гексаном, CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH. Фракция, полученная с помощью CH₂Cl₂, оказалась эффективным ингибитором продукции индуцированных ЛПС оксида азота и PGE-2 в макрофагах RAW 264.7.

Ингибирующий эффект сопровождался дозозависимым снижением экспрессии белков и генов iNOS и COX-2. Эта же фракция снижала в макрофагах уровень цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-6. Снижалась также экспрессия генов этих интерлейкинов. Все это свидетельствует о возможности получения из бурой водоросли *D. dichotoma* эффективных противовоспалительных субстанций.

В последние годы проводятся широкие исследования, в том числе, и авторами настоящей работы, касающиеся пребиотических свойств сульфатированных полисахаридов (Кузнецова и др., 2011; Ramberg et al., 2010). Основанием для этих исследований является способность биополимеров оказывать благоприятное влияние на течение и исход хронических воспалительных заболеваний желудочно-кишечного тракта (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, язвенные и эрозивные колиты и пр.), сопровождающихся дисбиозом - качественно новым состоянием симбиоза с взаимной агрессивностью симбионтов. Такое представление о дисбиозе требует иной стратегии лечения и иного подхода к разработке лекарственных средств, основанных на прямом использовании многочисленных метаболических, регуляторных и других взаимоотношений в системе «хозяин-микробиота» и восстановлении этих связей, когда они оказываются нарушенными (Киселев и др., 2004). Одно из ведущих мест в комплексной терапии и профилактике заболеваний, сопровождаемых дисбиозами, занимают пробиотики — живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения позитивные эффекты на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина через стабилизацию и оптимизацию функции его нормальной микрофлоры. Чаще всего это бифидобактерии и лактобациллы, способные проявлять антагонизм против патогенных и условно-патогенных микробов. С целью усиления лечебного эффекта пробиотиков целесообразно их сочетание с пребиотиками и функционально активными ингредиентами, дефицит которых является следствием дисбиоза. Такие комбинированные препараты относятся к группе синбиотиков (Gibson, Robertson, 1995). Одним из перспективных направлений в конструировании синбиотиков является использование в качестве пребиотиков БАВ из морских водорослей, таких как фукоиданы, ламинараны, альгинаты, каррагинаны и др. (Jimenez-Escrig et al., 2000; Wang et al., 2006; O'Sullivan et al., 2010; Leonard et al., 2011). Привлекательность использования сульфатированных полисахаридов при конструировании синбиотиков определяется, наряду с пребиотическими свойствами, широким спектром биологической активности, включая противовоспалительную, что приводит к нормализации

иммунного и метаболического статуса человека. В большинстве случаев противовоспалительные эффекты сульфатированных полисахаридов связывают со снижением повышенного уровня IL-6 и других провоспалительных цитокинов, продуцируемых эпителиальными клетками кишечника и поддерживающих хронические воспалительные процессы в желудочно-кишечном тракте. Так, *in vitro* на культуре клеток эпителия кишечника мышей СМТ-93 показана способность фукоиданов из водорослей *S. ocamuranus* и *Kjellmaniella crassifolia* подавлять повышенную продукцию IL-6. (Matsumoto et al., 2004). В исследованиях (Zhang et al., 2001) при использовании фукоидана из водоросли *S. ocamuranus* у мышей BALB/c с экспериментальным колитом, установлено снижение уровня IL-6, TGF β и миелопероксидазы. Фукоидан из фукусовых водорослей такого действия не оказывал. Эти исследования показывают, что при использовании фукоиданов в диетическом питании следует обращать особое внимание на вид водорослей, так как не все из них оказывают противовоспалительное действие.

В экспериментах на порослятах установлено положительное действие СПС на рост и размножение лактобактерий в кишечнике. Кроме того, количество патогенных бактерий снижалось в содержимом кишечника животных, зараженных сальмонеллами и получавших фукоидан (Sweeney et al., 2011).

В системе CACO-2 – RAW264.7 макрофаги стимулировали липополисахаридом. Стимуляция макрофагов вызывала снижение трансэпителиального электрического сопротивления, которое является маркером целостности клеток Caco-2, а также увеличение продукции TNF α и выраженность экспрессии mRNA IL-8 в Caco-2 клетках. Применение анти-TNF-антител или будезонида супрессировало продукцию TNF α и экспрессию mRNA IL-8. Данная модель имитирует воспаление кишечника *in vivo*. Фукоидан супрессировал экспрессию гена IL-8 путем сокращения продукции TNF α макрофагами, стимулированными липополисахаридом (Tanoue et al., 2008; Mizuno et al., 2009).

В наших исследованиях (Кузнецова и др., 2011) было показано, что фукоидан и альгинат из *F. evanescens* проявляют пребиотическую активность, свойственную пищевым волокнам: стимулируют рост и накопление биомассы бифидобактерий при их культивировании на питательной среде, обогащенной фукоиданом, альгинатом или их композицией, а также на среде, где эти полисахариды использовали вместо лактозы. Результаты этих экспериментов косвенно свидетельствуют об активном усвоении бифидобактериями исследуемых полисахаридов. В экспериментах *ex vivo* на модели лекарственного экспериментального дисбиоза у мышей подтвержден пребиотический потенциал исследуемых

полисахаридов при использовании в составе нового синбиотического продукта (кисло-молочного напитка с *B. bifidum*), применение которого приводило к восстановлению массы тела животных, нормализации кишечной микрофлоры (увеличению количества бифидо- и лактобактерий, типичной кишечной палочки) и снижению условно-патогенной микрофлоры (элиминация *Staphylococcus saprophyticus* и бактерий рода *Proteus*). Наличие пребиотической активности у полисахаридов из водоросли *F. evanescentis* открывает перспективы для их включения в состав продуктов функционального питания, биологически активных добавок к пище (БАД) и синбиотиков (препаратов, полученных в результате рациональной комбинации про- и пребиотиков) для коррекции нарушений микробиоценоза у человека и купирования воспалительных процессов в желудочно-кишечном тракте.

Таким образом, к настоящему времени доказано, что сульфатированные полисахариды из морских водорослей оказывают выраженное противовоспалительное действие на различных экспериментальных моделях патологических процессов и в клинических условиях при использовании их в виде БАД к пище, продуктов функционального питания, напитков. К сожалению, до настоящего времени еще нет лекарственных препаратов на основе этих чрезвычайно интересных и перспективных биополимеров. В организме сульфатированные полисахариды взаимодействуют с различными СПС-связывающими белками (факторами роста, цитокинами, хемокинами, протеазами и пр.) и могут играть двойную роль в иммунном ответе — ингибитора и стимулятора (Chen et al., 2008). При патологических процессах, сопровождающихся формированием иммунодефицита различной выраженности они действуют как инициаторы иммунного ответа — содействуют обнаружению и фиксации антигена, миграции лейкоцитов через эндотелий, повышению пролиферации лимфоцитов.

В других случаях, например, при гиперпродукции провоспалительных цитокинов или комплемента, фукоиданы действуют как блокаторы воспаления — снижают интенсивность воспалительного сигнала, индуцированного провоспалительными цитокинами, подавляют активацию комплемента и проникновение лейкоцитов через эндотелий.

Противовоспалительная активность фукоиданов может не коррелировать с антикоагулянтной активностью (Усов и др., 2008), что указывает на возможность получения фукоиданов с высокой противовоспалительной активностью, но при этом проявляющих слабое антикоагулянтное действие. Такие полисахариды перспективны в качестве лекарств для тех случаев, когда антикоагулянтная активность нежелательна.

Тот факт, что сульфатированные полисахариды являются полива-

лентными и многофункциональными агентами, обуславливает широкий спектр активности, что, с одной стороны, характеризует их как перспективные биологически активные вещества, с другой — создает много трудностей при работе с ними. В связи с этим возникает проблема стандартизации препаратов, которая осложняется тем, что химический состав водорослей зависит не только от вида, но и от многих других внешних и внутренних факторов (см. главу 4).

Глава 11. Антиинфекционные свойства сульфатированных полисахаридов

Живой мир многочисленных микроорганизмов в процессе эволюции постоянно пытается использовать для своей жизнедеятельности ресурсы сложных многоклеточных организмов, обойти действие иммунной системы и даже воспользоваться работой врожденных факторов защиты (Железникова, 2006; Ахматова, Киселевский, 2008). При этом одни микроорганизмы образуют капсулу, которая защищает их от фагоцитоза и мембраноатакующего комплекса комплемента, другие имитируют поверхность животной клетки, что делает С3b доступным для протеаз крови, третьи секретируют собственные протеазы, «срезающие» рецепторы фагоцитов, чувствительные к факторам, обуславливающим хемотаксис, так что фагоциты теряют направление движения в очаг воспаления. У многих патогенных бактерий существует извращенная система секреции бактериальных молекул, которые они вводят непосредственно в клетки млекопитающих или растений. Это III и IV типы секреции, формирующие канал доставки протеинов (или ДНК в случае IV типа) в клетки макроорганизма (Nagai, Roy, 2003). Существуют и другие типы секреторных систем патогенов: система I типа — путь, независимый от последовательности поступающих сигналов, II тип — терминальная фаза двухступенчатого секреторного процесса и V тип — собственно транспортный путь, который служит для перемещения различных белковых субстратов из внутренней части бактерий в экстрацеллюлярное пространство (Binet et al., 1997; Sandkvist, 2001; Desvaux et al., 2004).

Отдельные бактериальные патогены способны влиять на сигналы, идущие с TLRs, искажая или ослабляя их. У некоторых микроорганизмов в процессе конвергентной эволюции сформировались вирулентные белки, обладающие гомологией на нуклеотидном или аминокислотном уровнях, с эукариотическими белками, что затрудняет обнаружение бактериальных регуляторных TLR-сигналов. В связи с этим, становится очевидным, что патогены при захватывании макрофагами не только блокируют фагоцитоз, который частично регулируется TLR-зависимыми сигналами, но и оказывают ингибирующее влияние на активацию TLR (Blander, Medzhitov, 2004).

Вирусы в процессе эволюции также выработали механизмы ускользания от эффекторных функций врожденного иммунитета. Так, герпес-, ретро- и парамиксовирусы встраиваются в геном клеток без выраженной вирусемии и приобретают способность распространяться не только от клетки к клетке, но и через потомство инфицированных клеток. Тем, не

менее, во многих случаях генетические изменения в клетках не столь значительны, чтобы вызвать экспрессию вирусного антигена в количестве, достаточном для индукции сильного иммунного ответа (Vo, Kim, 2010).

Вирусы способны размножаться и в клетках, которые в норме находятся в условиях физиологической изоляции от действия иммунной системы. Слабый иммунный ответ возникает в случаях недостаточности образования комплекса между протеинами вируса и молекулами главного комплекса гистосовместимости I и II класса или торможения транспорта этого комплекса на поверхностную мембрану клеток. Вследствие ошибок в синтезе вирусной ДНК могут появляться новые варианты антигенов, входящих в состав вириона. Например, изменения в структуре gp120 ВИЧ ослабляют способность ранее синтезированных антител взаимодействовать с вирусом.

Вирусы могут также выделять белки, имеющие сходство с рецепторами к цитокинам (IFN, TNF и др.) и блокирующие активность медиаторов иммунного ответа. Некоторые растворимые вирусные молекулы блокируют активность антител, цитокинов и компонентов комплемента, предохраняя вирусы от разрушения.

При вирусных инфекциях происходит интенсивный распад собственных инфицированных клеток под влиянием иммунных факторов (антител, цитотоксических Т-лимфоцитов, Мф), что может привести к необратимым последствиям и развитию аутоиммунных заболеваний, а образование иммунных комплексов из вирусного материала и антител — к появлению иммунокомплексных поражений.

Особенности иммунитета при протозойных инфекциях обусловлены внутриклеточной локализацией паразита, изменчивостью его поверхностных антигенов, наличием антигенов, общих с антигенами хозяина. Интенсивность иммунного ответа при протозойных инфекциях очень слабая, так как уровень циркулирующих антител возрастает медленно и эффективность антител (IgM и IgG) недостаточна. В некоторых случаях антитела действуют на возбудитель только на определенной стадии его развития. Кроме антител, вызывающих гибель возбудителя, образуются антитела, индуцирующие его изменчивость. Многие простейшие, например плазмодии малярии и трипаносомы, вызывают сильную неспецифическую супрессию иммунного ответа хозяина. Инфекционный процесс прекращается лишь в том случае, если развивается клеточный иммунный ответ, как это имеет место при кожной форме лейшманиоза.

В связи с высокой приспособляемостью патогенов к условиям макроорганизма происходит постоянный поиск веществ и методов защиты от возбудителей, в частности, разработка способов прерывания первого этапа взаимодействия патогена с клетками макроорганизма - адгезии.

Адгезия — процесс, необходимый микроорганизмам (вирусам, бактериям, паразитам) для проникновения в организм. Первые стадии инфекционного процесса, связанные с адгезией микробных клеток на чувствительных клетках и последующей их колонизацией, являются конкретными проявлениями вирулентных свойств любого возбудителя. Феномен адгезии состоит из нескольких этапов, в результате которых микробные клетки прикрепляются или прилипают к поверхности эпителия. С одной стороны, в этом процессе принимают участие неспецифические физико-химические механизмы, обеспечивающие контакт между возбудителем и клетками организма хозяина и связанные с гидрофобностью микробных клеток, суммой энергий отталкивания и притяжения. С другой стороны, способность к адгезии определяется специфическими химическими группировками определенного строения - лигандами, находящимися на поверхности микроорганизмов, и рецепторами клеток, которые должны быть комплементарны друг другу.

Адгезины, отвечающие за прикрепление возбудителя к клеткам макроорганизма, очень разнообразны. Их уникальное строение, свойственное определенным видам и даже штаммам, обуславливает высокую специфичность данного процесса. Этим объясняется способность одних микроорганизмов прикрепляться и колонизировать преимущественно эпителий дыхательных путей, других — кишечного тракта, третьих — мочевыделительной системы и т.д.

Адгезины многих грамотрицательных бактерий связаны с пиллями разных типов. Адгезивную функцию грамотрицательных бактерий выполняют капсула и капсулоподобная оболочка, белки наружной мембраны клеточной стенки. У грамположительных бактерий эта функция связана с тейхоевыми и липотейхоевыми кислотами клеточной стенки, капсулой и капсулоподобной оболочкой. Так, образуемые из экзополисахаридов гликаны и леваны обеспечивают способность стрептококков прилипать к гладким поверхностям, например, к зубной эмали или эндопротезам.

Рецепторы клеток тканей человека также неоднородны по своему составу. Их подразделяют на нативные, индуцированные и приобретенные. Нативные рецепторы располагаются на эпителиальных клетках, участвуя в адгезии соответствующих бактерий. Индуцированные рецепторы образуются только после адсорбции вирусов на чувствительных клетках, после чего на них могут адгезироваться стафилококки и другие бактерии. Это объясняется тем, что рецептором для этих бактерий служит вирусный гемагглютинин, который встраивается в цитоплазматическую мембрану эпителиальных клеток. Данное положение приобретает большое значение для понимания механизмов возникновения вторичных бактериальных

инфекций при первичных вирусных заболеваниях, в частности, гриппа. Приобретенные рецепторы появляются при определенных условиях. Они представляют собой «мостики», связывающие эпителиальные клетки и бактерии и состоящие из иммуноглобулинов разных классов, альбуминов, фибронектина или других соединений, способных взаимодействовать с комплементарными бактериальными адгезинами.

Изучение молекулярной природы лиганд-рецепторных комплексов, образующихся при взаимодействии различных микроорганизмов с соответствующими им клетками-мишенями, а также факторов, влияющих на процесс адгезии *in vitro* и *ex vivo*, позволяет разработать профилактические меры, направленные на подавление ранних этапов инфекционного процесса (Парахонский, 2009; Ofek et al., 2003).

В основе поисков антиадгезивных препаратов лежит создание эффективных препятствий с разнообразными механизмами действия при установлении взаимодействия между лигандами и рецепторами. Одним из наиболее известных механизмов, с учетом которого осуществляется подбор ингибиторов процесса адгезии, является введение в систему микроорганизм-эукариотические клетки растворимых веществ, конкурирующих с лигандами или рецепторами за места связывания на клеточных поверхностях. При этом все растворимые соединения можно разделить на две группы, способные реагировать либо с возбудителем, либо с эукариотической клеткой. Избирательное связывание лигандов микроорганизмов предпочтительнее, так как в меньшей степени влияет на рецепторный аппарат клеток-мишеней, а через него — на самые разнообразные процессы в тканях макроорганизма.

Применение природных или синтетических аналогов клеточных рецепторов и компонентов тканевых жидкостей способно значительно снизить, а в отдельных случаях и полностью предотвратить прикрепление микроорганизмов к клеткам хозяина.

Возможность использования углеводов для защиты от экспериментальных инфекций путем уменьшения степени адгезии микроорганизмов за счет конкурентного взаимодействия была впервые показана в 1979 году (Aronson et al., 1979). Позднее, с целью защиты от патогенов *in vitro* и *ex vivo*, были исследованы различные БАВ, вплоть до полисахаридов ягод, зеленого чая и др. (Ofek et al., 2003; Lee et al., 2006). Из полисахаридов морского происхождения в качестве антиадгезивных биополимеров следует отметить хитозан (Liu et al., 2010), полисахариды из морских бактерий рода *Pseudoalteromonas* (Смолина и др., 2006), а также сульфатированные полисахариды бурых водорослей.

Как будет показано дальше, антиадгезивные свойства характерны

практически для всех СПС, как из наземных, так и из морских объектов, в том числе и для фукоиданов. Эти соединения эффективно ингибируют контакт патогенов различных таксономических групп с эукариотическими клетками. Антиадгезивные свойства СПС важны с точки зрения практической медицины, поскольку открывают возможность их использования в качестве средств, препятствующих колонизации эпителия слизистых и других тканей человека патогенными микроорганизмами.

В последнее время синтезированы протяженные фрагменты молекул фукоиданов, которые являются потенциальными ингибиторами адгезии микроорганизмов (Krylov et al., 2010). Первая серия соединений состояла из ди-, тетра-, гекса-, окта-, додека- и гексадекасахаридов, построенных из (1→3)-связанных остатков α-L-фукопиранозы, которые соответствовали структуре полисахаридов, выделенных из водорослей *Saccharina latissima* и *Chorda filum*. Вторая серия компонентов представляла собой ди-, тетра- и гексасакхариды, построенных из (1→3)- и (1→4)-связанных остатков α-L-фукопиранозы, подобные фрагментам фукоиданов из *F. evanescens*, *F. distihus* и др.

В настоящей главе представлены литературные и собственные материалы авторов, характеризующие противовирусное, антибактериальное и антипаразитарное действие СПС.

Антивирусное действие сульфатированных полисахаридов

В настоящее время известно около 500 различных вирусов, способных вызвать заболевание у человека. При этом практически каждый случай инфекционной болезни, обусловленной этими микроорганизмами, сопровождается формированием иммунодефицитного состояния.

Возможности практической медицины в борьбе с вирусными инфекциями пока еще очень ограничены. Вакцинопрофилактика с успехом применяется только в отношении немногочисленной группы вирусов-возбудителей тяжелых массовых заболеваний (полиомиелита, кори, гепатита В и др.), а многолетние трудоемкие поиски противовирусных средств привели к созданию единичных химиопрепаратов преимущественно узкого спектра действия.

В связи с этим остается актуальной разработка возможностей фармакологического контроля вирусных инфекций. Особое значение приобретает поиск лекарственных средств, сочетающих в себе иммуностимулирующее и противовирусное действие. В качестве таких потенциальных препаратов рассматриваются сульфатированные полисахариды из морских гидробионтов (водорослей), которые активируют механизмы противовирусной защиты, а в ряде случаев оказывают прямое действие на вирусы.

Быстрая защита от проникновения в организм вирусов может быть

создана путем стимуляции врожденного иммунитета с помощью патоген-ассоциированных структур, которые являются лигандами для Toll-like рецепторов (Семенов, Зверев, 2007, Takeda, 2005). При этом быстро активируются эффекторные механизмы и запускаются процессы, ведущие к элиминации патогена. Так, TLR2 распознают гемагглютинин вируса кори, вирус простого герпеса, цитомегаловирус, гликопротеины вирусной оболочки (Афанасьев и др., 2009). TLR3 взаимодействуют с двухспиральной РНК вирусов. TLR4 взаимодействуют с F-протеином (белок слияния) респираторно-синцитиального вируса и оболочечным белком ММТ вируса (*mouse mammary virus*). Доказательством этого является то, что в легких TLR4-дефицитных мышей респираторно-синцитиальный вирус сохраняется значительно дольше, чем у животных, имеющих TLR4 (Kurt-Jones et al., 2000). TLR7 и TLR8 распознают одноцепочечную РНК вирусов, а TLR9 взаимодействует с ДНК герпесвирусов.

Известно, что лигандами для TLR являются повторяющиеся молекулярные углеводные и липидные структуры, одноцепочечная (sRN A) и двухцепочечная РНК (ssRNA), CpG-мотив ДНК (*cytosine phosphate guanosine*). Имеются данные (Афанасьев и др., 2009) о взаимодействии TLR7 с синтетическим препаратом (*imidizoquinoline*), обладающим антивирусной активностью. Активированные гепарансульфатными олигосахаридами клетки микроглии передают сигнал через TLR4, используя MyD88 путь (Ausseil et al., 2008).

Чтобы избежать распознавания TLRs, вирусы постоянно мутируют. Однако некоторые признаки вирусов не изменяются в процессе мутаций, т.к. это привело бы к потере патогенности вирусных частиц. Противовирусный иммунитет основан на способности TLR «распознавать» именно эти «постоянные» признаки вирусов.

Как показали наши исследования, СПС из водорослей могут распознаваться TLR и являться лигандами для них. Связывание вирусных белков с TLR приводит к активации системы внутриклеточной передачи сигналов от мембраны к ядру и транскрипции генов цитокиновых каскадов, ответственных за активацию фагоцитов и других иммунокомпетентных клеток. Основным конечным этапом в передаче сигнала является активация ядерного фактора транскрипции NF-κB, который перемещается в ядро клетки, соединяется с NF-κB связывающим промотором и индуцирует экспрессию генов провоспалительных цитокинов и интерферониндуцибельных генов (Ковальчук и др., 2005).

Взаимодействие вируса с клеткой начинается с адсорбции - прикрепления патогена к специфическим рецепторам клеточной поверхности. В процессе адсорбции участвуют специальные прикрепительные белки

капсида или суперкапсида вируса, функцией которых является узнавание и взаимодействие со специфическими клеточными рецепторами (Нестерова, 2005). При наличии чувствительных клеток и условий для репродукции вируса достаточно прервать первую стадию прикрепления вирусных частиц к поверхности клетки, чтобы остановить развитие вирусной инфекции задолго до мобилизации специфических механизмов иммунологической защиты организма. Прикрепление и внедрение возбудителя в клетки эндотелия может осуществляться в процессе взаимодействия вируса с клеточными рецепторами - интегринными. Так, было показано, что хантавирус проникает в клетки эндотелия путем взаимодействия с β -интегринными. При этом патогенные и непатогенные хантавирусы взаимодействуют с различными типами интегринов - $\beta 3$ и $\beta 1$, соответственно (Деканенко, Ткаченко, 2004). Результатом взаимодействия является проникновение вируса в клетку путем эндоцитоза или за счет слияния вирусной и клеточной мембран.

Долгое время считалось, что механизмы репликации вирусов тесно переплетены с нормальным метаболизмом клетки и любые попытки вмешаться в процесс размножения вируса должны приводить либо к гибели клеток, либо к серьезным нарушениям как в инфицированных, так и в неинфицированных клетках. Изучение механизмов репликации вирусов показало, что некоторые вещества могут действовать избирательно, не затрагивая клетку хозяина. Поэтому важной задачей химиотерапии вирусных инфекций является поиск и создание эффективных антивирусных лекарственных средств на основе соединений, избирательно и специфически подавляющих адсорбцию и репродукцию вирусов и не затрагивающих процессов жизнедеятельности клеток и систем организма.

Сульфатированные полисахариды (фуканы, декстрансульфаты, гепарин, каррагинаны, сульфатированные хитозаны, синтетические поливинил- и полиэтиленсульфаты), а также экстракты водорослей, в которых содержатся СПС, в той или иной степени обладают противовирусной активностью по отношению к различным вирусам (флави-, тога-, арена-, рабдо-, ортопоксвирусам, а также семейству герпесвирусов) (Witrouw, De Clercq 1997; Vo, Kim, 2010; Rhimou et al., 2010). Особое внимание среди них привлекают соединения, ингибирующие размножение ретровирусов (Vives et al., 2005; Ghosh et al., 2009).

Ретровирусы — обширное семейство РНК-содержащих вирусов (*Retroviridae*), вызывающих заболевания преимущественно у позвоночных и обладающих уникальным механизмом репродукции. Характерной чертой для ретровирусов является наличие в составе вириона РНК-зависимой ДНК-полимеразы, иначе называемой обратной транс-

криптазой, которая обеспечивает синтез ДНК на матрице вирусной РНК внутри клетки-хозяина.

Структура вирионов ретровирусов включает 6 структурных белков, из них 4 внутренних (капсидных) негликолизированных и 2 гликопротеина оболочки. Капсидные белки несут группоспецифические межвидовые антигены и являются основой для разделения вирусов на роды и подроды. Гликопротеины являются типоспецифическими антигенами, которые участвуют в реакции нейтрализации. Геном ретровирусов представлен однонитчатой РНК с молекулярной массой 7 мДа и состоит из двух копий, каждая из которых является полноценным геномом и содержит одинаковую генетическую информацию. Проникая внутрь клетки, ретровирусная РНК превращается в ДНК путем обратной транскрипции и встраивается в геномную ДНК, которая с этого момента становится неотъемлемой частью генома клетки, а вирус становится провирусом. Известно, что основной клеткой-мишенью для вируса иммунодефицита человека (HIV) является CD4 лимфоцит - главный клеточный элемент становления и поддержки адаптивного иммунитета (Железнякова 2006; Ghosh et al., 2009). В некоторых типах клеток (CD4 - Т-хелперы, макрофаги, дендритные клетки) вирус может вызывать как продуктивную, так и персистентную инфекцию (Balzarini, Van Damme, 2007; Nikolic et al., 2007). Вирионы посредством гликопротеина gp120 прикрепляются к протеину CD4 - Т-лимфоцитов вместе с хемокином корецептора (CXCR4 или CCR5). В процессе образования такого тройного комплекса между gp120 и рецептором/корецептором происходит слияние между вирионом и цитоплазматической мембраной, что является промежуточным этапом к образованию gp41 вируса. После этого вирусный геном проникает в ядро клетки-мишени (Moore, Stevenson, 2000). В фазе репликации HIV нарушает презентацию антигена в комплексе с HLA-антигенами I и II классов.

В исследованиях Ю.Н. Лоенко (1999) на модели линии лимфобластных клеток МТ-4, высокопермиссивной к цитопатическому действию HIV-1 и чувствительной к размножению вируса, проведено изучение возможности ингибирования вирусной адсорбции различными концентрациями уронофукана, выделенного из бурой водоросли *L. japonica*. Цитотоксичность уронофукана *in vitro* на клетках МТ4 не проявлялась даже в концентрациях выше 5000 мкг/мл в сравнении с прототипным фукоиданом, для которого 50% цитотоксическая доза, определяемая по выживанию клеток МТ4 равна 1060 ± 210 мкг/мл или с азидотимидином (АЗТ Sigma), который был токсичен в концентрации, превышающей 1000 мкг/мл. Автором установлена полная защита Т-лимфобластных клеток МТ4 от цитопатического действия вируса иммунодефицита человека 1-го типа,

характеризующаяся прямой нейтрализацией вируса *in vitro* с помощью эффективных доз уронофукана, а также ингибированием вирусной адсорбции на клетках-мишенях, предварительно обработанных полисахаридом.

По другим данным (Gochfeld et al., 2003), фукоидан при HIV-инфекции не обладает прямым вируснейтрализующим действием, но ингибирует первую фазу репликации возбудителя на CD4+ за счет ионного взаимодействия сульфатных анионов с положительно заряженными элементами клеточной поверхности (McClure et al., 1992). Некоторые фракции фукоидана подавляют образование синцития HIV (Amornrut et al., 1999), снижают активность обратной транскриптазы, а также ингибируют как нативную, так и рекомбинантную гетеродимерную обратную транскриптазу (Beress et al., 1993). Выраженной анти-HIV активностью обладают каррагинаны (Pujol et al., 2007) и сульфатированные олигосахариды, синтезированные из ламинарана (Katsuraya et al., 1999).

M. Witvrouw и De Clercq (1997) описали возможность селективного подавления СПС из водорослей репликации HIV-1 в культуре клеток. По данным E.B. Damonte et al. (2004) и J. Trincherо et al. (2009) взаимодействие HIV с клетками блокирует СПС из бурых, красных и зеленых водорослей. Результаты исследований этих авторов позволили объяснить антивирусный эффект полисахаридов по отношению к оболочечным вирусам (ВИЧ, простого герпеса, цитомегаловируса, респираторно-синцитиального вируса), которые прикрепляются к клеткам путем взаимодействия оболочечного гликопротеина-С вируса и гепаран-сульфата на поверхности клетки. Комплекс вирус-клетка формируется путем неионных связей и ионного взаимодействия между анионной (главным образом, сульфатной) группой в полисахариде и основными аминокислотами гликопротеина. Неионное взаимодействие зависит от гидрофобных аминокислот, находящихся между основными аминокислотами в протеинсвязывающей зоне. Авторы выдвинули гипотезу о наличии соответствующих гидрофобных структур в полисахаридах. Антивирусная активность СПС из морских водорослей, по их мнению, основана на формировании подобных комплексов, которые блокируют взаимодействие вирусов с клетками.

Таким образом, что касается HIV-инфекции, то большинство авторов объясняют подавление HIV-1 инфекции в экспериментах *in vitro* блокированием сульфатированными полисахаридами рецепторов на клетках CD4+ и образования клеточного синцития (Bourgougnon et al., 1996; Damonte et al., 2004; Miao et al., 2004; Adhikari et al., 2006; Vo, Kim, 2010). Полученные результаты показали возможность применения СПС в качестве основы лекарственных препаратов для лечения и профилактики СПИД.

Сульфатированные полисахариды из красных микроводорослей

Porphyrium sp на модели культур клеток подавляют продукцию и других ретровирусов — вируса мышинной лейкемии (MuLV) и клеточную трансформацию, обусловленную вирусом мышинной саркомы (MuSV-124). Эффект был более значительным, если СПС вносили предварительно или одновременно с заражением клеток вирусом. Воздействие СПС после инфицирования также снижало число трансформированных клеток, однако эффект в этом случае был несколько ниже (Talyshinski et al., 2002). Поскольку подавление полисахаридами клеточной трансформации под действием MuSV-124 наблюдалось и после заражения, можно полагать, что полисахариды действуют не только на стадии адсорбции вируса, но и на поздних стадиях инфицирования — после интеграции провируса в геном клетки.

Противовирусное действие фукоидана установлено при его применении у пациентов с болезнью HAM/TSP (myelopathy/tropical spastic paraparesis), причиной которой является человеческий лимфотропный ретровирус HTLV-1, вызывающий также T-клеточную лейкемию (ATL). Высокая вирусная нагрузка у пациентов с HTLV-1 увеличивает у них риск возникновения еще и HAM/TSP. Кроме того, высокая вирусная нагрузка ассоциируется с клинической прогрессией HAM/TSP. Полисахарид подавлял трансмиссию вируса от клетки к клетке и снижал вирусную нагрузку. Таким образом, этот полисахарид можно рассматривать в качестве потенциального терапевтического средства при HTLV-1-ассоциированных болезнях (Araуa et al., 2011).

Многочисленные сообщения касаются противовирусной активности СПС, выделенных из различных видов водорослей, по отношению к вирусам герпеса (семейство *Herpesviridae*) (Schaeffer, Krylov, 2000; Caceres et al., 2000; Preeprame et al., 2001; Zhu et al., 2003; Stiles et al., 2008; Spavieri et al., 2009; Sinha et al., 2010; Skriptsova et al., 2010; Sun et al., 2010b). Вирусный геном герпесвирусов представляет собой линейную двухцепочечную молекулу ДНК. Семейство герпесвирусов по классификации Международного комитета по таксономии вирусов делится на подсемейства: α-, β-, γ- и подсемейство неклассифицируемых вирусов, вызывающих разнообразные болезни не только у человека и других млекопитающих, но и у птиц, рептилий, амфибий, рыб. При проникновении в организм хозяина, герпесвирусы адсорбируются на клетках-мишенях и освобождаются от капсида с последующим внедрением вирусной ДНК в ядро клетки, где происходит образование, созревание и последующее отпочковывание новых вирионов. Для оболочки вируса, его капсида и ДНК используются аминокислоты, белки, липопротеиды, нуклеозиды клетки-хозяина. По мере истощения внутриклеточных резервов эти молекулы поступают

в инфицированную клетку из межклеточных пространств. После острой первичной инфекции вирусы пожизненно персистируют в организме человека, проявляя высокую степень адаптации к его иммунной системе (Adhirari et al., 2006). В ходе своей жизнедеятельности вирусная ДНК экспрессирует определенные группы генов и, соответственно, кодируемых ими белков, которые собственно и определяют жизненный цикл вируса в клетках хозяина, приводя к изменению их фенотипических свойств, т.е. трансформации. Трансформация клеток вызывает развитие определенных иммунопатологических реакций, направленных против собственного организма и приводящих к вирусиндуцированной иммуносупрессии и длительной персистенции вируса в организме человека. В клетках своего хозяина они переходят в латентное состояние, при этом нарушается полный репродуктивный цикл вируса, который находится в клетках хозяина в виде субвирусных структур. Заболевание человека вызывают восемь типов вирусов герпеса. Сложность герпесвирусной инфекции определяется биологическими особенностями вирусов: внутриклеточным паразитированием, пожизненной персистенцией в аксоноганглиальных структурах центральной и периферической нервной системы, многократным реинфицированием новыми штаммами (при этом возможно одновременное сосуществование нескольких типов вирусов), переходом в активную форму при нарушении динамического равновесия между иммунным гомеостазом и вирусами. Особенностью вируса простого герпеса является ускользание от иммунологического контроля. В связи с этим у больных герпесвирусной инфекцией снижены продукция эндогенного IFN, активность NK-клеток и антителозависимая цитотоксичность, уменьшено абсолютное число и снижена активность Т-лимфоцитов (CD3+ и CD4+ клеток) и Нф, повышено количество иммунных комплексов. В условиях ослабленного иммунологического контроля не только становится невозможной полная элиминация внутриклеточно расположенного вируса, но и создаются благоприятные условия для распространения возбудителя. Нарушения в иммунном статусе сохраняются как в фазе рецидива, так и в фазе ремиссии, что необходимо учитывать при лечении больных герпесвирусной инфекцией. Особенно тяжело, с осложнениями и генерализацией процесса заболевание протекает у лиц с ярко выраженной иммунодепрессией.

Лечение хронических, часто рецидивирующих форм герпесвирусной инфекции (HSV), характеризующейся острыми воспалительными проявлениями, разнообразием клинической картины, а также устойчивостью к стандартной противовирусной терапии, представляет значительные трудности. В связи с этим внимание ученых привлечено к СПС, ко-

торые обладают значительной противовирусной активностью. Так, в работе J. Lee et al. (2004b) показано ингибирующее действие на вирус *Herpes simplex* одиннадцати натуральных СПС из десяти видов зеленых водорослей и четырех синтетических сульфатированных ксиланов - аналогов 1,3-β-D-ксилана. По данным авторов действие биополимеров ассоциировано не только с подавлением адсорбции, но, что очень важно, с влиянием на поздние этапы внутриклеточной репликации. Следует отметить, что основное количество исследований, посвященных этому вопросу, свидетельствует о преимущественном действии СПС на стадию прикрепления вируса к клеткам хозяина (Carlucci et al., 1997; Lee et al., 2004ad; Mohsen et al., 2007). Однако есть работы, свидетельствующие о влиянии высоких концентраций СПС и на стадию репликации вирусов. Так, СПС, полученные из бурых водорослей *Sargassum horneri* (Preerame et al., 2001) и *S. patents*, подавляли репликацию вируса HSV-2, действуя более эффективно на стадии адсорбции, а высокие концентрации СПС обладали и вирулицидной активностью. Избирательную противовирусную активность против герпесвирусов проявлял полисахарид из красной водоросли *Gracillaria corticata* (Mazumder et al., 2002).

В других исследованиях установлено, что СПС из водоросли *Grateloupia indica* обладали ингибирующим действием на вирусы HSV1 и HSV-2 только в случае их добавления в культуру клеток в течение периода адсорбции (Chattopadhyay et al., 2007). Антивирусным действием против HSV-1 обладали и экзополисахариды, полученные из морской губки *Celtodoryx girardae* (Rashid et al., 2009).

Одновременно с подавлением адсорбции вирусов герпеса, СПС оказывают выраженное действие на факторы врожденного и адаптивного иммунитета. Так, в работе Hayashi et al. (2008) установлено не только ингибирующее действие фукоидана из бурой водоросли *Undaria pinnatifida* на адсорбцию и репликацию вируса HSV-1, но и показан стимулирующий эффект на функциональную активность Мф и NK-клеток. Под действием фукоидана наблюдалось повышение CTL-активности, а также быстрое появление вируснейтрализующих антител, которые сохранялись в крови в течение трех недель (Hayashi et al., 2008).

Обращает на себя внимание способность некоторых СПС, в частности фукоидана, полученного из красной морской водоросли *Crioptoleura ramosa*, к селективному подавлению репликации вирусов простого герпеса HSV-1 и HSV-2 на клетках Vero, а также в нервных клетках мышей (Carlucci et al., 1997). Ингибирующее действие фукоидана было обусловлено действием на адсорбцию вируса к клеткам, при этом полисахарид не обладал антикоагулянтными свойствами.

В настоящее время известно, что противовирусное действие фукоиданов зависит от структуры биополимера. Так, при исследовании действия различных фракций сульфатированного фукана из бурой водоросли *Cystoseira indica* в отношении вирусов HSV-1 и HSV-2 на клетках Vero установлено, что противовирусная активность зависит от молекулярной массы, структуры фракций и содержания в них галактозы и остатков глюкуроновой кислоты (Mandal et al., 2007). Аналогичные данные представлены в работе N.M. Ponce et al. (2003), исследовавших действие фукоиданов из бурой водоросли *Adenocystis utricularis*. Авторы показали, что фукоиданы в зависимости от способа экстрагирования имеют различный состав и противогерпетическую активность. Галактофукан, содержащий, в основном, остатки L-фукозы и D-галактозы, не обладал цитотоксичностью по отношению к клеткам Vero и проявлял более высокую ингибирующую активность в отношении HSV-1 и HSV-2 по сравнению с D- L-фуканом, который, помимо остатков L-фукозы, содержал также Glc, Xyl, Rha, Gal и уроновых кислот.

На антивирусную активность СПС влияет и степень их сульфатирования (Sinha et al., 2010). Так, фукоидан, содержащий 0,8–1,2 сульфатных групп (S1-S3), обладал ингибирующей активностью по отношению к HSV-1 и HSV-2 (Karmakar et al., 2010), а десульфатирование фукоидана из водоросли *Schacilaria indica* приводило к потере противовирусного действия.

В последние годы появились сообщения о механизмах действия СПС на первый этап герпесвирусного инфекционного процесса. На культурах клеток показано, что эти соединения блокируют HS-цепи на клеточной поверхности и тем самым препятствуют адгезии вирусных частиц. Адгезия вируса герпеса может быть ингибирована также путем насыщения вирусного гликопротеина 3-0 сульфатированным олигосахаридом, полученным путем ферментативной трансформации гепарина (Copeland et al., 2008; O' Donnel, Shukla, 2008).

Вследствие того, что эффективность репликации большинства вирусов зависит от специфических внутриклеточных сигнальных путей, связанных с поверхностью клетки, индукция последних может обеспечить определенную часть антивирусного эффекта СПС. В частности, одним из объяснений его может быть активация синтеза интерферона, в результате чего наблюдается выраженное антивирусное действие (Rechter et al., 2006).

Действие СПС было достаточно высоко оценено и в клинических исследованиях на добровольцах с герпесвирусной инфекцией (Cooper et al., 2002). Как правило, такие пациенты получают ацикловир, однако длительное использование этого лекарственного препарата приводит к появлению резистентных штаммов вируса. Альтернативой могут быть

нетоксичные СПС из морских водорослей, ингибирующие адсорбцию вирусов, или проявляющие вирулицидный эффект.

Свойство СПС подавлять адсорбцию вирусов герпеса может, как показывают эксперименты, помочь при местном применении пациентам с герпетическими поражениями половых органов, а также при офтальмогерпесе (Zaharopoulos, Phillips, 1997; Talarico et al., 2004; Stiles et al., 2008). Вагинальные составы, содержащие каррагинаны, эффективно защищали мышей от заражения HSV-2. Лямбда- и йота-каррагинаны в виде 1%-ного раствора защищали практически всех животных от заражения вирусом герпеса.

В качестве антигерпетических средств широко исследуют не только СПС и их фрагменты, но и экстракты водорослей (Zandi et al., 2007; Harden et al., 2009). Так, экстракт водоросли *Ulva fasciata* вызывал 60% ингибирование образования синцития. Экстракты водорослей *Sargassum vulgare* и *Vidalia obtusiloba* тормозили образование синцития в 78% случаев, а ингибирование контактов клеток между собой усиливало защиту от инфекции (Romanos et al., 2002).

Экстракт водоросли *Hydroclathrus clathratu*, содержащий углеводные компоненты, дозозависимо подавлял HSV, включая ацикловир-резистентные штаммы (Wang et al., 2008). Экстракты водорослей *U. pinnatifida*, *Splachnidium rugosum*, *Gigartina atropurpurea* и *Plocamium cartilagineum* оказывали ингибирующее действие на герпесвирусы HSV-1 и HSV-2 даже в небольших концентрациях, только в том случае, когда их добавляли на стадии адсорбции (Harden et al., 2009).

СПС оказались эффективными при целом ряде других экспериментальных вирусных инфекций. Так, фукоидан из бурой водоросли *Macrocystis pyrifera* ингибировал цитопатическое действие вируса ве-зикулярного стоматита. Сульфатированный экзополисахарид, выделенный из морской микроводоросли *Gyrodinium empuadicum*, оказался эффективным в экспериментах с вирусом энцефаломиокардита (Yim et al., 2004), лямбда-каррагинан *in vitro* подавлял адсорбцию вируса африканской лихорадки свиней (Garcia-Villalon, Gil-Fernandez, 1991). Скрининг СПС, обладающих антивирусной активностью, позволил установить, что фукоидан ингибирует адсорбцию на клетках Vero вируса москитной лихорадки (*Plebovirus* сем. *Bunyaviridae*).

Серия DL-галактанов из красной водоросли *Gfymnogongrus torulosus* оказывала ингибирующий эффект в отношении вируса Денге (Pujol et al., 2002). По данным авторов, галактаны, полученные из двух видов красных водорослей, обладали низкой цитотоксичностью и ингибирующим действием, способствуя 50% снижению образования бляшек на клетках,

однако обработка вирионов препаратами не дала положительного результата. Авторы считают, что галактаны, как и другие СПС, препятствуют адсорбции вирусов на клетках. Аналогичные результаты в отношении вируса Денге получили L.B. Talarico et al. (2005).

Исследование зависимости между структурой СПС и проявлением функциональной активности по отношению к вирусу Денге позволило установить, что фукоидан, полученный из водоросли *Cladosiphon okamuranus*, в состав которого входили остатки глюкуроновой кислоты и сульфатированной фукозы, при обработке вирусных частиц избирательно ингибировал только 2-й тип вируса.

О связи строения и противовирусной активности фукоидана из бурой водоросли *Cladosiphon okamuranus*, и его модифицированных аналогов в отношении вируса Денге сообщают и другие авторы (Nagaoka et al., 1999; Jiao et al., 2011). Установлено, что фукоидан теряет активность не только после десульфатирования, но и после восстановления карбоксильных групп уронных кислот. Таким образом, ответвления от главной цепи фукоидана в виде остатков D-глюкуроновой кислоты, наличие которых снижает антикоагулянтные свойства, необходимы для проявления противовирусной активности (Cumashi et al., 2007). Из четырех известных серотипов вируса Денге фукоидан ингибировал только один, прочно связываясь с гликопротеином его оболочки. С двумя другими серотипами фукоидан взаимодействовал слабо. С четвертым он вообще не взаимодействовал. Этим отличиям соответствовала разница в составе и расположении аминокислот в молекулах гликопротеинов. Так, в положении 323 гликопротеина, чувствительного к фукоидану штамма вируса Денге, находится остаток аргинина, который в двух других серотипах заменен на менее основной остаток лизина. Гликопротеин серотипа, не взаимодействующего с фукоиданом, имеет в этом положении остаток глутамина, лишенный основных свойств. K.I.P.J. Hidari et al (2008) считают, что именно этот фрагмент молекулы гликопротеина взаимодействует с карбоксильными группами остатков глюкуроновой кислоты в фукоиданах. Фукоидан, в котором остатки глюкуроновой кислоты были восстановлены до глюкозы, не ингибировал инфекцию, вызванную вирусом Денге, а удаление сульфатных групп заметно снижало ингибиторную активность комплекса (Hidari et al., 2008). Эти исследования открывают перспективы использования фукоидана при инфекции, вызванной особо опасным вирусом лихорадки Денге.

Противовирусная активность сульфатированных полисахаридов установлена и в отношении вируса табачной мозаики (ВТМ). Установлено, что фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* (Лапшина 2007) и кар-

рагинаны из красных водорослей (Барабанова и др. 2005; Reunov et al. 2004) ингибируют репликацию ВТМ в клетках листьев табака. Авторы отмечают, что в степени ингибирующего эффекта существенную роль играет структура полисахарида. Присутствие в структуре каррагенов сульфатных групп, является обязательным, но не единственным условием для проявления антивирусного действия, также, по мнению авторов, существенную роль играют вторичная структура и молекулярная масса биополимера. Так, лямбда-каррагинан содержал наибольшее количество сульфатных групп, но проявлял наименьшую антивирусную активность, которая заключалась в препятствии образования количества ВТМ-индуцированных локальных некрозов на листьях табака. Полисахариды, обладающие антивирусным эффектом, характеризовались низкой степенью сульфатирования и высоким содержанием 3,6-ангидрогалактозы.

Среди природно-очаговых вирусных нейроинфекций клещевой энцефалит (КЭ) до настоящего времени остается актуальной проблемой для здравоохранения в связи с эпидемической значимостью и широким распространением на территории Российской Федерации.

Вирус КЭ относится к семейству *Flaviviridae*. Возбудитель поражает двигательные нейроны передних рогов шейного сегмента спинного мозга, мозжечка, мягкую оболочку головного мозга, а репродуцируется в лимфоцитах, в клетках печени, селезенки, эндотелия сосудов.

Способность вируса КЭ длительное время сохраняться в активном состоянии в клетках центральной нервной системы даже после адекватного лечения острых форм болезни и опасность перехода инфекционного процесса в прогредиентную форму обосновывают необходимость поиска новых препаратов для лечения и профилактики. Учитывая, что фукоиданы обладают противовирусной активностью, нами было исследовано протективное действие полисахарида, выделенного из бурой водоросли *L. japonica* при экспериментальном КЭ у мышей (Макаренкова и др., 2009).

В эксперименте использовали вирус КЭ дальневосточного субтипа, штамм Р-73, выделенный из мозга человека с очаговой формой инфекции. Неинбредных мышей инфицировали однократно подкожно в дозе $10 \text{ LD}_{50}/0,2 \text{ мл}$ (инфекционный титр вируса $7,5 \lg \text{ LD}_{50}/0,2 \text{ мл}$). При использовании профилактической схемы животным вводили фукоидан однократно и ежедневно в течение пяти дней в дозе 100 и 400 мкг на особь за 24 часа до заражения, а по лечебной схеме — через 1 час после инфицирования. Под наблюдением в течение 21 дня находились следующие группы животных: 1-я группа — контроль (животные, инфицированные вирусом КЭ); 2-я группа — животные, получавшие фукоидан внутрибрюшинно (профилактическая схема); 3-я группа — животные,

которым вводили фукоидан внутримышечно (профилактическая схема); 4-я группа — инфицированные животные, получавшие фукоидан внутрибрюшинно (лечебная схема); 5-я группа — инфицированные животные, которым вводили фукоидан внутримышечно (лечебная схема).

За животными проводили ежедневное визуальное наблюдение. Признаками заболевания считали вялость, ограничение подвижности, взъерошенность шерсти, отсутствие аппетита, парезы и параличи конечностей. В каждой группе рассчитывали показатели летальности на каждый день наблюдения. Результаты оценивали с учетом выживаемости, средней продолжительности жизни (СПЖ) и увеличением СПЖ (УСПЖ) животных по С. Гланцу. Летальность мышей в контрольной группе составила 100% на 11-й день наблюдения, а СПЖ — $9,98 \pm 0,38$ дня.

Наибольший протективный эффект зарегистрирован при профилактическом однократном внутрибрюшинном введении фукоидана в дозе 400 мкг (2-я группа), что обеспечивало достоверную 40% защиту животных на 11 день и 30% выживаемость ($\alpha=0,041$) по сравнению с контрольной группой. К окончанию срока наблюдения СПЖ составила $12,83 \pm 0,62$ дней ($p=0,039$), а УСПЖ=26,55%.

При внутримышечном введении, наибольшее протективное действие установлено при многократном введении полисахарида в дозе 100 мкг (3-я группа), что способствовало 30% достоверной выживаемости животных, СПЖ= $12,6 \pm 0,32$ дней ($p=0,027$) и УСПЖ=26,25%. Однократное введение способствовало 20% выживаемости ($\alpha=0,058$), при СПЖ= $12,7 \pm 0,67$ и УСПЖ=27,25% ($p=0,045$).

Исследование противовирусной активности при введении фукоидана через час после заражения (лечебная схема) показало, что внутрибрюшинное введение полисахарида в течение 5 дней в дозе 400 мкг (4-я группа) обеспечивало 40% достоверную защиту на 11 день по сравнению с гибелью животных в контрольной группе. На 21 день выживаемость животных составила 20%, СПЖ - $12,4 \pm 1,3$ дней, а УСПЖ=24,64%.

Внутримышечное введение фукоидана через 1 час после заражения показало эффективность многократного применения обеих доз полисахарида (5-я группа животных). Наибольшее протективное действие установлено при введении фукоидана в дозе 400 мкг, что способствовало достоверной 50% защите животных на 11 день и 30% выживаемости в группе к окончанию срока эксперимента ($\alpha=0,041$). СПЖ составила $12,14 \pm 0,11$ дней ($p=0,032$), а УСПЖ=21,64%.

В механизме иммуномодулирующей активности СПС особая роль принадлежит их способности индуцировать синтез и секрецию провоспалительных цитокинов клетками моноцитарно-макрофагального

ряда, что способствует активации эффекторных функций Нф, Мф и НК-клеток, усилению фагоцитоза, пролиферации лимфоцитов и увеличению синтеза IFN- γ НК-клетками.

Увеличение выживаемости животных, зараженных вирусом КЭ, при однократном введении фукоидана, по-видимому, обусловлено активацией факторов врожденного иммунитета и секрецией провоспалительных цитокинов. Формирование защиты против вируса при многократном введении полисахарида связано с активацией гуморальных и клеточных факторов адаптивного иммунитета.

Как было сказано выше, противовирусная активность фукоиданов может быть обусловлена ингибированием адсорбции и последующей репликации вирусов в клетках макроорганизма за счет их связывания с определенными мембранными молекулами на клеточной поверхности.

Известно, что за адсорбцию вируса КЭ, взаимодействие с рецепторами клеток и слияние вирусной и клеточной мембран отвечает экспонированный на поверхности вирионов гликопротеин Е (Романова, 2006). Рецепторами для вируса КЭ на поверхности клеток являются гликопротеины, гепарансульфаты и ламининсвязывающий белок. Высказано предположение, что на поверхности гликопротеина Е вируса существует участок, который может взаимодействовать с разными типами рецепторов для ламинина: интегринами, сульфатированными полисахаридами, гликолипидами, а также неинтегриновыми мембранными протеинами, в состав которых входит ламининсвязывающий белок (Романова, 2006). Это позволяет предположить, что СПС наряду с гепарансульфатами и ламининсвязывающим белком могут являться одними из ко-рецепторов для вируса КЭ. Возможно, что в результате конкурентного лиганд-рецепторного взаимодействия происходит связывание фукоидана с гликопротеином вируса, что препятствует слиянию клеточной и вирусной мембран, ведет к ингибированию адсорбции вируса и способствует созданию защиты у инфицированных мышей.

Еще одной инфекцией, при которой достаточно активно исследуется действие СПС из гидробионтов, является грипп. Так, в работе J. Serkkedjieva (2004) показана возможность подавления цитопатогенного действия вируса гриппа на модели эмбрионов кур экстрактами из красных водорослей *Ceramium rubrum*. Эффект был штаммоспецифическим. Цитопатогенное действие вируса гриппа ингибировали также СПС из морских водорослей *Cochlodinium polycrioides* (Hasui et al., 1995) и *Gracillaria lemaneiformis* (Chen et al., 2010). Антивирусная активность соединений, как правило, была связана с отношением содержания сульфатных групп. В полисахаридах из *Gracillaria lemaneiformis* (Chen et al.,

2010) этот показатель составил 13%, что ассоциировалось с высокой антивирусной активностью. Ингибирующее действие на цитотоксический эффект, авторы связывают с нарушением процесса адсорбции вирусных частиц на клетках.

В работе A. Leibrandt et al. (2010) установлено, что йота-каррагинан задерживает гибель клеток MDCK, инфицированных вирусом гриппа H1N1A/PR/8/34 и H3N2A/Aichi/2/68. Аналогичные результаты получены на культуре клеток назального эпителия, где авторы показали, что йота-каррагинан подавлял рост пандемического вируса гриппа H1N1/2009.

Появление и распространение нового варианта вируса гриппа птиц, способного передаваться от человека к человеку, поставило перед учеными задачу разработать новые противовирусные препараты, обладающие лечебно-профилактическим действием, эффективно ингибирующие или подавляющие репликацию вируса H5N1 в клетках. В связи с этим нами было исследовано противовирусное действие фукоидана из бурой водоросли *L. japonica* в отношении вируса гриппа птиц A/H5N1 (Макаренкова и др., 2010).

Высокопатогенный штамм вируса A/duck/Novosibirsk/02/05 H5N1 (Genbank DQ864711) выделен из внутренних органов домашней птицы во время эпизоотии 2005 года в Новосибирской области и депонирован в Государственную коллекцию вирусов (Львов и др., 2006). В исследованиях использовали цитопатогенный для культуры клеток СПЭВ (эпителиальные клетки почек эмбрионов свиней) вирус, инфекционный титр которого составил 10^8 ТЦИД₅₀/мл.

Цитотоксические свойства фукоидана изучали путем воздействия различных концентраций полисахарида (100, 125, 200, 250, 500 мкг/50 мкл на лунку) на интактные клетки СПЭВ. Результаты учитывали по проявлению цитодеструктивных и морфологических изменений клеток через 72 часа. Вирулицидную активность фукоидана определяли путем экспозиции фукоидана с вирусосодержащим материалом (в соотношении 1:1); через определенные промежутки времени (0, 5, 10 и 30 мин). Инфекционный титр вируса гриппа в контрольных и опытных образцах определяли методом титрования остаточной инфекционности в культуре клеток СПЭВ. Результаты учитывали через 72 часа.

Противовирусную активность и протективное действие фукоидана изучали после внесения различных концентраций (от 125 до 2500 мкг/мл) за час до заражения, одновременно и через 1 час после инфицирования клеток СПЭВ вирусом A/H5N1 (в дозе 1,0; 0,1 и 0,01 ТЦИД₅₀). Через 24 часа после инфицирования, когда в монослое не регистрировались явления цитодеструкции, из лунок отбирали пробы культуральной среды

и 10-кратно титровали на культуре клеток. Результаты способности фукоидана защищать инфицированные клетки СПЭВ путем предотвращения развития вирусиндуцированного ЦПД учитывали через 72 часа.

Установлено, что фукоидан из *L. japonica* не оказывает цитотоксического действия и не вызывает морфологических изменений в культуре клеток СПЭВ, обладает вирулицидной способностью (табл. 11.1) и подавляет инфекционные свойства вируса A/H5N1, причем степень ингибирования инфекционной активности вируса прямо пропорциональна времени экспозиции полисахарида с вирусосодержащим материалом. Так, экспозиция вируса с фукоиданом в течение 5 и 10 минут снижает титр вируса на 3,0 и 3,5 lg ТЦИД₅₀ соответственно, а через 30 минут на 4,0 lg ТЦИД₅₀ по сравнению с контролем (8,0 lg).

Таблица 11.1

Вирулицидная активность фукоидана в отношении вируса A/H5N1

Время экспозиции вируса с фукоиданом	Титр вируса A/H5N1 (lg ТЦИД ₅₀ /мл)		
	Контроль вируса M±Sб	Фукоидан (500 мкг/мл) M±Sб	p
0 мин.	8,0 ± 0,5	8,0 ± 0,29	0,643
5 мин.		5,0 ± 0,57	0,003
10 мин.		4,5 ± 0,50	0,001
30 мин.		4,0 ± 0,29	0,000

Примечание: M±Sб — средняя арифметическая ± стандартная ошибка средней арифметической. Me±S — отклонение (с учетом значений). p — достоверность полученных значений (T-test, критерий Стьюдента).

При исследовании способности фукоидана защищать инфицированные вирусом A/H5N1 клетки СПЭВ выявлено, что протективное действие полисахарида зависит от дозы вируса, используемой при заражении. Установлено, что фукоидан не защищает клетки СПЭВ, инфицированные вирусом в дозах 1,0 и 0,1 ТЦИД₅₀, но обладает протективным действием (концентрация 500—2500 мкг/мл) при инфицировании вирусом в дозе 0,01 ТЦИД₅₀.

Изучение противовирусной активности фукоидана из *L. japonica* на ранней стадии развития инфекции, после заражения вирусом A/H5N1 в дозе 0,1 ТЦИД₅₀ показало (табл. 12.2), что предварительная экспозиция клеток СПЭВ с полисахаридом за час до заражения, снижает инфекционный титр вируса на 2,5—3,0 lg ТЦИД₅₀. Одномоментное внесение полисахарида и вируса гриппа в культуру клеток снижает титр вируса на 1,5—2,5 lg по

сравнению с контролем ($7,0 \pm 0,5 \lg$). Противовирусного эффекта фукоидана, внесенного через 1 час после инфицирования клеток не выявлено.

При инфицировании культуры клеток СПЭВ вирусом гриппа птиц А/Н5N1 в дозе 0,01 ТЦИД₅₀ установлено, что предварительная экспозиции клеток с фукоиданом за час до заражения полностью ингибирует инфекционную активность вируса по сравнению с контролем ($6,5 \pm 0,5 \lg$). Получены данные и о высоком лечебно-профилактическом действии фукоидана в момент инфицирования клеток вирусом. Установлено, что полисахарид снижает титр вируса на 2,0–3,0 lg, а в высокой концентрации подавляет развитие инфекции в культуре клеток СПЭВ. Противовирусная активность фукоидана, полностью ингибирующая продукцию вируса, выявлена только и при внесении высокой концентрации полисахарида через 1 час после инфицирования клеток СПЭВ.

Таким образом, фукоидан из бурой водоросли *L. japonica* характеризуется вирулицидными свойствами в отношении высокопатогенного вируса гриппа А/Н5N1, обладает способностью защищать культуры клеток от цитопатогенного действия вируса и подавлять его продукцию на ранних стадиях развития инфекции.

Исследование рецепторной специфичности вируса гриппа птиц показало, что адаптация вирусов разных эволюционных линий к организму кур привела к изменению его рецепторной специфичности. У Н5N1Н9N2 и Н7N7 вирусов повысилась сродство к сульфатированным рецепторам с лактозаминовым кором и фукозилированными рецепторам.

По химической структуре низкосульфатированный и частично ацетилированный фукоидан из бурой водоросли *L. japonica* отличается высоким содержанием галактозы. Мы считаем, что антивирусное действие фукоидана из *L. japonica* по отношению к вирусу А/Н5N1 реализуется за счет связывания с определенными мембранными рецепторами на клеточной поверхности, а также конкурентных углеводспецифических взаимодействий с гликопротеинами вируса, учитывая, что существенным для гемагглютинаина вируса А/Н5N1 является распознавание специфических рецепторов галактозы на клетках хозяина.

Таблица 11.2

Исследование противовирусной активности фукоидана на ранней стадии инфицирования культуры клеток СПЭВ вирусом гриппа А/Н5N1

Время введения фукоидана	Титры вируса гриппа А (Н5N1) в пробах среды инфицированных клеток СПЭВ (lg ТЦИД ₅₀ /мл), через 24 часа после обработки фукоиданом						
	Доза вируса ТЦИД ₅₀	Контроль вируса М±S6	Концентрация фукоидана мкг/мл				
			125	250	500	1000	2500
			М±S6	М±S6	М±S6	М±S6	М±S6
За 1 час до инфицирования клеток	0,1	7,0±0,57	7,0±0,29	4,5±0,57**	4,0±0,57**	4,0±0,5***	4,0±0,0***
	0,01	6,5±0,5	6,5±0,29	0***	0***	0***	0***
В момент инфицирования клеток	0,1	7,0±0,57	6,5±0,5	6,0±0,29*	5,5±0,5*	4,5±0,5**	4,5±0,29***
	0,01	6,5±0,5	6,5±0,5	6,5±0,29	4,5±0,57**	3,5±0,5**	0***
Через 1 час после инфицирования клеток	0,1	7,0±0,57	7,0±0,29	6,5±0,29	6,5±0,5	6,0±0,5*	6,0±0,0*
	0,01	6,5±0,5	6,5±0,29	6,5±0,5	6,0±0,5	6,0±0,0	0***

Примечание: М±SD6 — средняя арифметическая ± среднее квадратичное отклонение; p - достоверность полученных значений (Т-test, критерий Стьюдента); * — p≤0,05; ** — p≤0,01; *** — p≤0,001.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) входит в группу хантавирусных инфекций и регистрируется в России на многих территориях, включая европейскую часть страны и районы Дальнего Востока. Разнообразная клиническая картина, нередкое возникновение неотложных состояний у больных обуславливают сложность терапии и делают лечение этого вирусного природно-очагового заболевания важной проблемой для здравоохранения.

Вирус ГЛПС относится к семейству *Bunyaviridae*, роду *Hantavirus*. Хантавирусы проявляют сильный тропизм к эндотелиальным клеткам всего организма, но реплицируются преимущественно в легочных эндотелиоцитах и макрофагах (Zaki et al., 1995). В макрофагах происходит синтез нуклеопротеидов и первичных оболочек вируса без очевидного цитопатического действия (Плехова и др., 2003; Плехова и др., 2005; Zaki et al., 1995). Следовательно, макрофаги могут выступать в роли

длительного источника хантавируса и принимать участие в процессе его диссеминации в организме (Плехова и др., 2003).

Проникновение вируса в клетку-мишень осуществляется путем рецепторно-опосредованного эндоцитоза с помощью β 3-интегринов, которые являются оболочечными поверхностными рецепторами эндотелиальных клеток, тромбоцитов и макрофагов (Gavrilovskaya et al., 1999; Hall et al., 2008). Существуют два различных по патогенетическим точкам приложения способа защиты организма от хантавирусной инфекции: путем воздействия на рецепторы вируса (Hall et al., 2008) или за счет блокады клеточных рецепторов (Gavrilovskaya et al., 1999). В обоих случаях блокируются начальные этапы вирусной репродукции, связанные с прикреплением вируса к оболочке восприимчивой клетки и его проникновением в цитоплазму.

Нарушение нормальной конфигурации клеточных мембран вызывает снижение способности чувствительных клеток адсорбировать вирус, что, вероятно, связано с уменьшением количества клеточных рецепторов. Сульфатированные полисахариды способны избирательно реагировать с некоторыми белками и специфически модифицировать клеточную поверхность.

Мы исследовали антивирусное действие фукоиданов из бурых водорослей *L. japonica*, *L. cichorioides* и *F. evanescens* по отношению к вирусу Хантаан (прототипный штамм 76-118 выделен из суспензии легких полевой мыши *Apodemus agrarius koreae*) в двух модельных системах - *in vivo* и *in vitro* (Макаренкова и др., 2008; Максема, Макаренкова, 2008).

Исследование *in vitro* проведено на модели перитонеальных макрофагов мышей (титр вируса 10^5 ТКИД₅₀/мл). В работе применяли две схемы экспериментов. В первом случае — предварительно инкубировали макрофаги с различными концентрациями фукоиданов, во втором варианте — фукоиданы предварительно инкубировали с вирусом. Контролем являлись интактные макрофаги и Хантавирус. Противовирусную активность полисахаридов оценивали в НМФА по их способности снижать процент инфицированных перитонеальных макрофагов. Результаты учитывали по формуле: среднее количество светящихся клеток/100 макрофагов (СКК/100 МФ).

Установлено, что наибольшим ингибирующим действием обладает низкомолекулярный и низкосульфатированный полисахарид из *L. japonica*. Предварительный контакт хантавируса с фукоиданом в течение 1 часа и 30 мин до заражения макрофагов приводил к снижению адсорбции вируса по сравнению с контролем, в среднем до 12,3%, а при обработке макрофагов - до 30,6% СКК/100 МФ.

Полностью сульфатированный высокомолекулярный фукоидан из *L. cichorioides* также обладал выраженным антиадсорбционным действием. Предварительный контакт фукоидана с вирусом в течение часа подавлял адсорбцию до 15,6%, а при обработке макрофагов — до 28,8% по сравнению с контролем. Контакт в течение 30 минут приводил к снижению адсорбции до 25,2 и 38,9% соответственно.

Низкосульфатированный фукоидан из *F. evanescens* обладал менее выраженным действием. Возможно, что его низкая активность связана с наличием примеси полиманнуроновой кислоты, которая снижает концентрацию активного вещества. Так, при предварительной обработке вируса в течение часа адсорбция снижалась до 28,7%, а при обработке макрофагов — до 43,0% по сравнению с контролем. При 30-минутном контакте снижение адсорбции составило 37,2 и 59,0% соответственно.

Учитывая полученные результаты, для исследования антиадсорбционного действия фукоиданов в зависимости от дозы и времени взаимодействия был выбран полисахарид из *L. japonica*. Установлено, что предварительная инкубация макрофагов с фукоиданом в дозе 100 мкг/мл снижает адсорбцию вируса в среднем до 46%, при обработке вируса в течение 15 мин — до 17%, 30 мин и 1 часа — до 29% по отношению к контролю. Фукоидан в дозе 500 мкг/мл подавляет адсорбцию до 38% при обработке макрофагов и до 18% — при предварительном контакте с вирусом. В дозе 1000 мкг/мл адсорбция хантавируса в среднем снижалась до 29% и 13,5% соответственно.

При исследовании действия фукоидана *L. japonica* на пенетрацию вируса Хантаан установлено (рис 11.1), что предварительная обработка фукоиданом как вируса, так и макрофагов препятствует дальнейшему проникновению вируса в клетки в течение 1, 2, 4 и 6 часов за счет блокирования рецепторов и ингибирования адсорбции на клетках мишенях. Снижение числа антигенсодержащих клеток в контроле через 2 часа после заражения свидетельствует о проникновении вирусных частиц в клетку, а последующее их увеличение через 4–6 часов инкубации связано с преобразованием внутри макрофагов вирусных частиц, активацией вирусного генома, что приводит к изменению метаболизма клеток, появлению вирусспецифических и вирусиндуцированных образований и репродукции вируса (Плехова и др., 2005).

Исследование *in vivo* вирусингибирующей активности фукоиданов из бурых водорослей *L. japonica*, *L. cichorioides* и *F. evanescens* (доза 5 мг/кг), были проведены на модели экспериментальной хантавирусной инфекции мышей (титр вируса 3,1 ФФЕ — фокус формирующие единицы/мл). Под наблюдением находились следующие группы мышей: 1-я группа — кон-

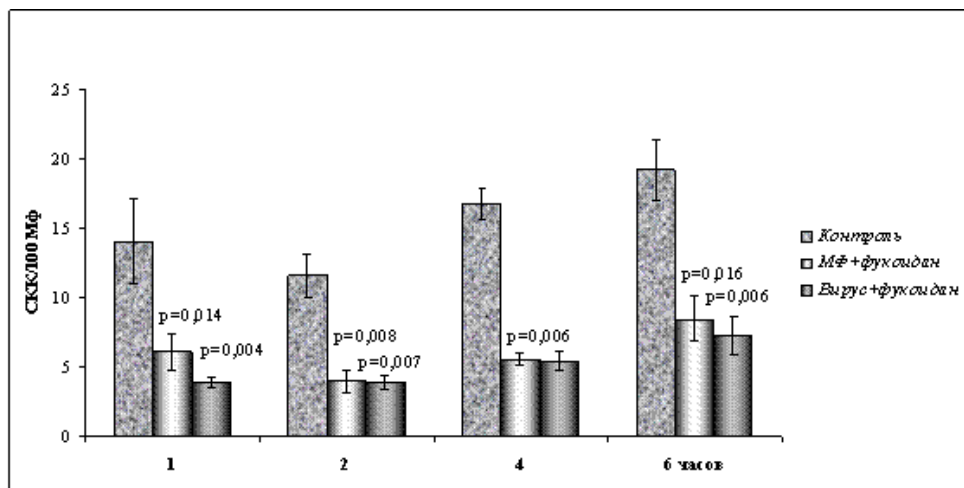


Рис. 11.1. Влияние фукоидана из *L. japonica* на проникновение хантавируса в макрофаги.
Примечание: p — достоверность полученных значений по сравнению с контролем (T-test, критерий Стьюдента)

троль-животные, зараженные хантавирусом; 2-я группа — инфицированные мыши, которым за 5 дней до и в течение 5 дней после заражения внутримышечно вводили фукоидан из *L. japonica*; 3-я группа — инфицированные мыши, которым вводили фукоидан из *L. cichorioides*; 4-я группа — инфицированные мыши, которым вводили фукоидан из *F. evanescens*.

Наблюдение за животными вели 35 суток. Исследование перитонеальных макрофагов у зараженных мышей проводили через 30 мин, 1, 2, 4, 6, 24, 48 и 72 часа, 7, 10, 14, 21 и 35 суток.

Установлено, что фукоиданы из бурых водорослей *L. japonica* и *L. cichorioides* подавляют инфекционность хантавируса преимущественно в начальную фазу инфекционного процесса. Так, полисахарид из *L. japonica* снижал через 30 мин после заражения число инфицированных клеток у животных в 5,7 раза, а через 1 час — в 1,9 раза по сравнению с контрольной группой. При введении фукоидана из *L. cichorioides* количество зараженных клеток было снижено по сравнению с контролем в 3,2 раза. Фукоидан из *F. evanescens* не оказывал влияние на ранние этапы развития инфекционного процесса.

Через 2 часа после заражения происходило снижение показателя инфицированных макрофагов во всех группах, что может быть связано с распадом белковой оболочки вируса и высвобождением нуклеиновой кислоты (Соловьев, Баландин, 1973).

В следующие 4–6 часов полисахарид из *L. japonica* снижал число инфицированных клеток у животных в среднем в 2,2 раза, полисахарид из *L.*

cichorioides — в 1,7 раза, а фукоидан из *F. evanescens* — в 1,5 раза.

Дальнейшие исследования, проведенные в течение 1-й недели после заражения (24, 48 и 72 часа и 7 суток), показали, что количество инфицированных макрофагов в контрольных и опытных группах мышей практически не отличалось. В то же время положительный эффект фукоиданов в той или иной степени был выявлен на 10-е, 14-е и 21-е сутки. Установлено, что фукоидан из *L. japonica* оказывает наиболее выраженное защитное действие. Показатель инфицированных клеток при использовании этого полисахарида по сравнению с контролем на 10–21 день снижался в среднем в 2,3 раза. Действие других СПС было менее выражено. В отдаленные сроки экспериментальной хантавирусной инфекции (35-е сутки) показатели контроля и опыта в данной лечебно-профилактической схеме не различались.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что фукоиданы водорослей порядка *Laminaralis* эффективно защищают мышей от хантавируса на начальном этапе развития инфекционного процесса. Снижение числа инфицированных перитонеальных макрофагов у животных в первый час после заражения, возможно, связано со способностью фукоиданов блокировать проникновение вируса в клетки путем конкурентного взаимодействия с $\alpha V\beta 3$ -рецепторами ($\beta 3$ -интегрины). Однако, учитывая широкий спектр инфицированных тканей при ГЛПС и пантропизм возбудителя, резонно предположить, что наличие рецепторов ($\beta 3$ -интегринов) не всегда определяет чувствительность клетки к хантавирусу. Кроме этого в литературе имеются данные об использовании хантавирусами корецепторов для инфицирования клеток-мишеней (Krautkramer, Zeier, 2008). Это наводит на мысль о том, что на клеточных мембранах, по-видимому, не существует специфичных, строго гомологичных и высокоаффинных рецепторов к белкам G1 и G2, способных реализовать проникновение вируса в клетки организма человека, и механизм вирусно-клеточного взаимодействия является многофакторным. Подтверждением данного предположения служит также обнаружение двух частично перекрывающихся антигенных сайтов на белке G1 с различными функциональными свойствами (Arikava et al., 1992).

Известно, что в процессе адсорбции вирион проникает в клетку, прикрепляясь к ее поверхности участками одного или обоих гликопротеинов (G1 и G2), с последующим эндоцитозом. Гликопротеины, обладающие гемагглютинирующей активностью и индуцирующие рН-зависимое клеточное взаимодействие, играют важную роль в прикреплении вируса к поверхности чувствительных клеток и при «раздевании» на начальной стадии инфекции (Деканенко, Ткаченко, 2004). Предполагается, что необ-

ходимым условием проникновения вируса в клетку является закисление эндосом, что приводит к изменению трансформации гетеродимеров G1 и G2 и способствует слиянию клеточной и вирусной мембран (Maskov, Gavrilovskaya, 2001). По-видимому, механизм противовирусного действия сульфатированных полисахаридов реализуется за счет конкурентных углеводспецифических взаимодействий с мембранными рецепторами, в частности с Toll- и scavenger-рецепторами клеток, что способствует активации сигнального каскада и развитию защитных эффекторных механизмов, а также за счет лиганд-рецепторного взаимодействия и блокирования гликопротеинов (G1 и G2) хантавируса, что приводит к ингибированию адсорбции, препятствует слиянию клеточной и вирусной мембран и последовательно снижает репликацию вируса в клетках.

Несмотря на то, что фукоиданы в той или иной степени подавляли первичное размножение хантавируса у инфицированных животных, они не оказывали полного ингибирующего действия на инфекционный процесс. С течением времени вирус достигал оптимальной концентрации, и показатель инфицированных макрофагов практически не отличался в опытных и контрольной группах. Высокая противовирусная активность препаратов в разгар инфекции (10-й—14-й дни), по-видимому, связана с их высоким иммуномодулирующим действием. Полученные результаты позволяют считать, что фукоиданы бурых водорослей обладают способностью стимулировать напрямую или опосредованно (через продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками) выработку специфических антител.

Патогенез хантавирусной инфекции включает в себя несколько стадий, начиная с участия клеток респираторного тракта в раннем иммунном ответе и заканчивая развитием полиорганной недостаточности, основой которой является вовлечение в инфекционный процесс обширной поверхности клеток эндотелия сосудов и тканевых макрофагов. При этом инфицирование нового органа или ткани в начальный период болезни может быть следствием взаимодействия вируса с альтернативным клеточным рецептором. Данное направление исследований представляется перспективным в плане разработки новых подходов к процессу прерывания адсорбции вируса на клетках-мишенях.

Большое значение в изучении противoinфекционной активности сульфатированных полисахаридов имеют исследования, направленные на поиск новых иммунобиологических препаратов, обладающих лечебно-профилактическим действием в отношении заболеваний, вызванных прионами (proteinaceous infectious particles) (Taylor et al., 2002; Dohura et al., 2007).

Прионы представляют особый класс инфекционных агентов, состоящих из белка и не содержащих нуклеиновых кислот (PrP - prion protein). Нор-

мальный прионный белок - PrP играет важную роль в жизнедеятельности организма млекопитающих, участвуя в передаче нервных импульсов и в поддержании так называемых «циркадных» ритмов, регулируя суточные циклы активности и покоя в клетках, органах, организме в целом (Зуев 1999a,b). Превращение PrP, в ген Prnp, присутствующий в геноме всех млекопитающих, птиц, рыб и инфекционную форму - PrP^{Sc} происходит путем конформационного перехода.

Прионные болезни, вызывая развитие губчатых энцефалопатий у животных (коровье бешенство, скрэпи овец) и нейрогенеративных заболеваний у человека (болезни Крейтцфельда-Якоба, Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, фатальная бессонница, куру), являются смертельными. Они обуславливают нарушение процессов формирования пространственной структуры белков, приводящих к вне-и внутриклеточному накоплению растворимых белковых агрегатов фибриллярной структуры и изменениям клеточной физиологии (Шкундина, Тер-Аванесян, 2006).

В связи с тяжестью и летальностью прионных болезней постоянно ведутся поиски методов и средств лечения/профилактики этих заболеваний, в том числе, и среди сульфатированных полисахаридов наземного и морского происхождения.

Установлено, что сульфатированные полисахариды продлевают инкубационный период скрепи у мышей (Покровский, Киселев, 1998; Покровский и др., 2004) и обладают ингибирующей активностью в отношении амилоидогенеза, вызванного PrP^{Sc} в Sc⁺-клетках нейроblastомы (Покровский, Киселев, 1998). При этом уменьшение числа сульфатных групп значительно снижает их ингибирующую активность. В то же время некоторые полисахариды, содержащие большое количество сульфатных групп, не обладали способностью блокировать сборку PrP^{Sc} в амилоид. По-видимому, для действия полисахаридов важно не только число отрицательно заряженных сульфатных групп, но и молекулярная масса. Известно, что у вирусов полисахариды блокируют рецепторзависимый эндоцитоз, но механизмы их действия на самосборку PrP^{Sc} в амилоид пока неясны. В.И. Покровский и др. (2004) полагают, что сульфатированные полисахариды очень близки по структуре к сульфатированным глюкозаминогликанам, которые являются компонентами межклеточного матрикса и клеточных мембран и входят в состав амилоидных бляшек. Поэтому возможно, что синтетические полигликаны интерферируют (конкурируют) с эндогенными полиаминогликанами в образовании амилоидных бляшек. Крайне важно и то, что эта группа веществ снижает нейротоксичность PrP^{Sc}, т.е. защищает нейроны от апоптоза, индуцированного PrP^{Sc} и фрагментами его протеолиза (Dohura et al., 2007).

В исследованиях *in vivo* показано, что сульфатированные глиуканы пролонгировали инкубационный период у мышей, зараженных прионами (Ouidja et al., 2007). Введение полисульфата пентозана, аналога гепарина, в желудочек мозга мышей повышал выживаемость животных, зараженных PrP^{sc} (Horonchik et al., 2005). Фукоидан из водоросли *Cladosiphon okamuranus* оказывал профилактический эффект в эксперименте на зараженных мышах, продлевая инкубационный период и задерживая развитие инфекционного процесса по сравнению с контролем (Dohura et al., 2007; Irhimeh et al., 2005; Guimaraes, Mourao, 1997). Также отмечено, что сульфатированные полисахариды, введенные внутривенно и внутрибрюшинно, подавляли репликацию прионов в лимфо-ретикулярной системе (Farguhar et al., 1999; Mabbot, McPherson, 2006). Другой возможный механизм действия сульфатированных полисахаридов может состоять в том, что полисахариды усиливают выделение прионов через ЖКТ, что подтверждается фактом детоксикации и изменением спектра микрофлоры (Dohura et al., 2007).

Антибактериальное действие сульфатированных полисахаридов

Сульфатированные полисахариды уже давно являются объектом активного изучения в качестве антибактериальных средств, так как оказывают прямое антагонистическое действие по отношению к широкому спектру патогенов, а также препятствуют адгезии микроорганизмов на эукариотических клетках. Большое количество работ, в том числе и наших, посвященных этому вопросу, было опубликовано в 90-х годах прошлого века. Антиадгезивное действие фукоиданов было показано для *Bordetella pertussis* на модели клеточной линии WiDr (Brennan et al., 1991), *Corinebacterium diphtheriae* к клеткам буккального эпителия (Макаренкова и др., 1999), *Chlamidia trachomatis* на культуре клеток эпителия человека (Zaretzky et al., 1995) и т.д.

Актуальными в настоящее время являются исследования, касающиеся *Helicobacter pylori*, которые являются одной из причин гастроуденальных заболеваний желудочно-кишечного тракта, и представляют серьезную проблему в связи с увеличением резистентности к антибактериальным препаратам (Loke et al., 2007; Montecusso, Rappuoli, 2001). По мнению ряда авторов, инфекционный процесс, вызываемый *H. pylori*, инициирует развитие канцерогенеза (лимфомы и карциномы желудка) (Montecusso, Rappuoli, 2001; Цодиков и др., 2011). В связи с этим, в литературе достаточно часто обсуждается вопрос об эрадикации *H. pylori* и снижение интенсивности воспалительного процесса с помощью сульфатированных полисахаридов из разных видов водорослей (Kimura et al., 2000; Cheng et al., 2007).

Установлено, что в экспериментах *ex vivo* при гастрите, вызванном *H. pylori*, наблюдалось ослабление симптомов при добавлении фукоидана в рацион питания животных. При этом эффективность действия полисахаридов, по-видимому, зависит от pH среды. Так, фукоидан из бурой водоросли *Cladosiphon okamuranus* (*Cladosiphon fucoidan*) ингибировал прикрепление *H. pylori* к слизистой желудка при pH=2,0 и 4,0, тогда как ингибирующее действие других исследуемых фукоиданов выявлено только при pH=2,0 (Shibata 2003). Ингибирующий эффект на *H. pylori* отмечен и у фукоиданов из водорослей *F. vesiculosus* и *F. evanescens*.

В исследованиях N. Lutau et al. (2011) на модели макрофагов показано, что ингибирующая активность фукоидана в отношении *H. pylori* превышает действие гепарина. Установлено, что фукоидан более эффективно подавлял адгезию бактерий рода *Helicobacter spp.* (*H. hepaticus*, *H. pullorum* и *H. bilis*) на мышинных макрофагах клеточной линии J774A.1, что по мнению авторов, открывает перспективы использования фукоидана для профилактики и лечения хеликобактерной инфекции.

Клинические испытания фукоидана при хеликобактерной инфекции у людей, в условиях рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого эксперимента, показали, что число инфицированных лиц после применения фукоидана значительно снизилось в опытной группе по сравнению с группой плацебо (Back et al., 2011).

Таким образом, фукоиданы в перспективе могут использоваться для защиты от инфицирования человека *H. pylori* и в качестве противоязвенного средства.

Кроме того, сульфатированные полисахариды, в частности, фукоидан из *Laminaria spp.* улучшают состав микрофлоры кишечника за счет увеличения числа лактобацилл (Lynch et al., 2009). Наши исследования при разработке новых продуктов функционального питания на основе молочнокислого бифидумбактерина и фукоидана, показали, что фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens* в условиях макроорганизма оказывал еще и выраженный иммуномодулирующий и противовоспалительный эффекты, нормализовал липидный спектр и снижал уровень сахара в крови (Каленик и др., 2009). [Кузнецова и др., 2011; Каленик и др., 2009].

Особую актуальность в настоящее время приобретает поиск и разработка препаратов, обладающих одновременно антимикробными и иммуномодулирующими свойствами, и сульфатированные полисахариды бурых водорослей, полностью удовлетворяют этим требованиям. Наши исследования (Запорожец, Беседнова, 2007) показали, что фукоиданы, обладают выраженным иммуномодулирующим и антибактериальным действием в отношении *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*,

Yersinia pseudotuberculosis, *Staphylococcus aureus*. Установлено, что все микроорганизмы проявляли высокую чувствительность к фукоидану из бурой водоросли *L. japonica*. Наибольшее бактерицидное действие фукоидана после 15-минутного контакта выявлено по отношению к *E. coli* и *Y. pseudotuberculosis*, а через 2 часа контакта погибали практически все микроорганизмы. Протективный эффект фукоидана в экспериментах на мышах, зараженных *S. enteritidis* к окончанию срока эксперимента составил 60—70% выживших животных в зависимости от используемой концентрации полисахарида, при 100% летальности животных в контрольной группе.

Большое число исследований касается антибактериального действия экстрактов морских водорослей или суммарных полисахаридных фракций, полученных из экстрактов (Taskin et al., 2007; Aoun et al., 2010) по отношению к грамположительным и грамотрицательным микроорганизмам и грибам. В последние годы среди экстрактов морских водорослей найдены достаточно эффективные ингибиторы роста *S. aureus* (Taskin et al., 2007; Howayda et al., 2007; Ibtissam et al., 2009; Kantachumpoo, Chirapart, 2010), а экстракты водорослей *Lobophora variegata* и *Udotea conglutinata* обладают избирательной активностью по отношению к возбудителю *Trichomonas vaginalis* (Моо-Пус et al., 2008).

Одним из самых распространенных возбудителей нозокомиальных инфекций является *Pseudomonas aeruginosa*, который плохо поддается лечению, в связи с выраженной резистентностью к лекарственным средствам, передаваемой R-плазмидами. Механизм резистентности возбудителя обусловлен блокадой транспорта препарата к внутриклеточной мишени (анатомические особенности поверхностных структур) и инактивацией ферментами (β -лактамазы инактивируют пенициллины и цефалоспорины, ацетилтрансфераза и нуклеотидаза инактивируют аминогликозиды). Учитывая, что сульфатированные полисахариды обладают широким спектром биологической активности, был проведен ряд исследований их действия в отношении *P. aeruginosa*. Установлено, что метанольные и этанольные экстракты, содержащие низкомолекулярные метаболиты, достаточно эффективно ингибируют рост *P. aeruginosa* in vitro, что открывает перспективы получения на основе соединений из бурых водорослей лекарственных препаратов нового поколения. Осложняет эти исследования тот факт, что структура и, соответственно, биологическая активность этих соединений зависит от многих факторов, в частности, от условий произрастания водорослей, вида гидробионта, сезона сбора и т.д. (Усов, Билан, 2009; Имбс и др., 2010; Marti et al., 2004; Salvador et al., 2007; Scriptsova et al., 2010).

Антипаразитарное действие сульфатированных полисахаридов

Сульфатированные полисахариды обладают антипаразитарным действием. Так, in vitro установлен дозозависимый ингибирующий эффект фукоидана из бурой водоросли *F. vesiculosus* на размножение паразита *Babesia bovis*, который вызывает тяжелое заболевание, сопровождающееся лихорадкой, анемией, синдромом гипотонического шока, а в тяжелых случаях заканчивается поражением мозга и гибелью больных (Takabatake и др., 2004). Вероятно, что фукоидан связывает эритроциты, инфицированные *B. bovis*, через антиген паразита, который обладает аффинностью по отношению к полисахаридам.

Фукоидан из бурой водоросли *U. pinnatifida* подавлял in vivo и in vitro инвазию мерозоитов малярийного плазмодия в эритроциты, и не оказывал токсического действия на культуру клеток RAW264.7 (Chen et al., 2009; Clark et al., 1997). Низкомолекулярный фукоидан подавлял развитие *P. berghei* в клетках HepG2 и инвазию спорозоитов в клетки яичников китайских хомячков (Ying et al., 1997), ингибирующее действие фукоидана установлено и в отношении широко распространенного среди людей и животных паразита *Toxoplasma gondii* (Ortega-Barria, Boothroyd, 1999).

В исследованиях Maruyama et al. (2007) установлено, что фукоидан из бурой водоросли *U. pinnatifida* даже в низких концентрациях подавлял прикрепление ооцист паразита *Cryptosporidium parvum* к клеткам кишечного эпителия человека и новорожденных мышей, тогда как десульфатированный фукоидан таким действием не обладал, что свидетельствует о значении сульфатных групп в ингибировании адгезии паразита. Кроме того, можно считать доказанным, что фукоидан способен подавлять криптоспориоз посредством прямого связывания рецепторов эпителиальных клеток кишечника у новорожденных мышей (Maruyama et al., 2007).

Антипаразитарный эффект против *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *T. cruzi*, *Leishmania donovani* оказывали и экстракты из бурых и зеленых водорослей (Spravieri et al., 2009), антипаразитарное действие которых связано, прежде всего, с ингибированием адгезии паразитов к клеткам организма хозяина.

Полианионный сульфатированный полисахарид из бурых водорослей оказался эффективным и в качестве средства для подавления лейшманий (*L. donovani*) как чувствительных, так и устойчивых к препаратам сурьмы. Подавляя размножение лейшманий в макрофагах, фукоидан способствовал полностью снятию паразитарной нагрузки в печени и селезенке, что связано с переключением Th2-ответа на Th1 и увеличению продукции спленоцитами супероксида и NO (Kar et al., 2011).

Представленные данные свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований антивирусного, антибактериального и антипара-

зитарного действия сульфатированных полисахаридов с целью разработки новых лекарственных средств. Учитывая иммуномодулирующие и антиинфекционные свойства сульфатированных полисахаридов, их можно отнести к поколению новых препаратов с ассоциированной модулирующей активностью.

Глава 12. Применение сульфатированных полисахаридов для коррекции нарушений при эндотоксинемии

В настоящее время сепсис остается одной из самых актуальных проблем современной медицины. Это связано с неуклонной тенденцией к росту заболеваемости и высокой летальностью, несмотря на интенсивные исследования, касающиеся его лечения и профилактики. Особый интерес вызывает сепсис, индуцированный эндотоксинами, в связи с центральной ролью эндотоксинов грамотрицательных бактерий в различных проявлениях септического шока.

Эндотоксин или липополисахарид (ЛПС), являющийся компонентом клеточной мембраны грамотрицательных бактерий, играет роль триггера при сепсисе. Сформулирована концепция о роли эндотоксиновой агрессии в иммунопатогенезе различных заболеваний инфекционной и неинфекционной природы. Согласно этой концепции эндотоксиновая агрессия – универсальный общебиологический процесс, обусловленный избыточным содержанием в кровотоке ЛПС и абсолютной или относительной недостаточностью антиэндотоксинового иммунитета (Лиходед и др., 1996; Яковлев, 2003). Проникая в системный кровоток, ЛПС (эндотоксин) взаимодействует с гуморальными и клеточными факторами иммунитета и инициирует комплекс патологических процессов, включающих кардио-пульмональную и сосудистую дисфункцию, гиперкоагуляцию и развитие ДВС-синдрома, острую почечную и печеночную недостаточность и другие нарушения. Эти процессы являются результатом как прямого, так и опосредованного действия эндотоксина (ЛПС-индуцированных гуморальных и клеточных реакций) (Афанасьева, Чеснокова, 2008; Еськов и др., 2004; Лиходед и др., 1996; Яковлев, 2003). Таким образом, эндотоксиновая агрессия – универсальный фактор патогенеза различных заболеваний человека и животных.

У млекопитающих и человека, основу мембранных комплексов, распознающих различные вещества микробного происхождения, в частности ЛПС, составляют Toll-подобные рецепторы (TLRs), которые являются ключевыми структурами, распознающими ЛПС и запускающими экспрессию факторов врожденного иммунитета и системную воспалительную реакцию (Симбирцев, 2005; Modlin et al., 1999; Vasselon, Detmers, 2002). ЛПС также способен реагировать с такими клеточными рецепторами, как CD14, CD18, CD54 и др. (Яковлев, 2003).

Исход взаимодействия ЛПС с клетками макроорганизма зависит от его концентрации: умеренная активация клеток и систем при низких

дозах ЛПС (считается, что поступление небольшого количества ЛПС в кровь у здоровых является необходимым условием для поддержания физиологического иммунитета) и гиперактивация — при высоких. В последнем случае развивается неконтролируемый генерализованный ответ организма и септический синдром, выражающийся в системном поражении тканей и органов, что может заканчиваться развитием таких осложнений, как ДВС-синдром, эндотоксический шок, острая полиорганная недостаточность (ПОН) (Рябиченко и др., 2004; Таболин и др., 2003; Яковлев, 1993) или «эндотоксиновой агрессией», имеющей многочисленные клинические и лабораторные проявления (Яковлев, 2003).

Принципиальные механизмы патогенеза эндотоксинового шока согласно современным взглядам можно представить следующим образом: ЛПС, преодолевая антиэндотоксиновые барьеры организма, проникает в системный кровоток, где взаимодействует с нейтрофилами, моноцитами/макрофагами, эндотелиальными, дендритными клетками. Активированные клетки продуцируют комплекс эндогенных медиаторов: цитокинов (прежде всего TNF α , IL-1, IL-12, IL-6, IL-8), фактора активации тромбоцитов (FAT), монооксида азота, компонентов системы комплемента, метаболитов арахидоновой кислоты и др. Развивающийся при эндотоксиновой агрессии цитокиновый хаос или дисбаланс и метаболические сдвиги приводят к нарушению микроциркуляции, гипоксии и выраженной дисфункции органов и систем организма, формированию ПОН и развитию эндотоксинового шока. Среди множества эндогенных медиаторов, влияющих на развитие эндотоксинового шока, цитокины играют наиглавнейшую роль (Руднов, 2000; Ayala et al., 2000).

Существует мнение, основанное на результатах по моделированию эндотоксинового шока, что смертность при сепсисе обусловлена сверхстимуляцией иммунной системы. Так, парентеральное введение экспериментальным животным очищенных препаратов ЛПС вызывает развернутую картину эндотоксинового шока (Игонин и др., 2004; Deitch, 1998). Упомянутые авторы также считают, что комплекс патологических реакций, развивающихся после введения ЛПС, не является результатом его прямого токсического действия на жизненно важные функции макроорганизма, а системная воспалительная реакция развивается в результате избыточного проявления естественных защитных реакций хозяина. При этом уровень цитокинов, в первую очередь TNF α , очень высок, и животные погибают от цитокиновой бури. По мнению же большинства исследователей, именно цитокиновый дисбаланс, а не гиперцитокинемия имеет большое значение в патогенезе тяжелого сепсиса (Игонин и др., 2004; Козлов, 2006; Черных и др., 2001).

В отношении противовоспалительных медиаторов при сепсисе и ДВС ряд авторов отмечают существенное повышение уровня IL-4 (раннего) и IL-10 (позднего) цитокинов, что рассматривается ими как благоприятный признак (Кузник и др., 2002; Latifi et al., 2002; Wahl, Wallace, 2001). Доказательством положительной роли IL-10 в развитии септического шока является экспериментальная модель по наложению лигатуры на слепую кишку. При этом у мышей, дефицитных по IL-10, септический шок развивался на 10 часов раньше, чем у нормальных животных, а введение этого цитокина после индукции сепсиса способствовало увеличению выживаемости животных (Gerard et al., 1993; Remick et al., 2001).

Таким образом, сепсис — особое патологическое состояние, которое развивается при неадекватном течении инфекционного процесса в ослабленном организме. Для сепсиса типична ситуация несоответствия этиопатогенной нагрузки барьерным возможностям иммунитета. В этих условиях защитные барьеры иммунной системы оказываются прорванными, а инвазия этиопатогенов становится бесконтрольной. Кроме того, при сепсисе возникает дисбаланс регуляторных систем, контролирующей воспалительную реакцию, прежде всего цитокинов и других факторов. Одновременно развивается общая иммунодепрессия, которая является важным компонентом клеточной дисфункции при сепсисе, развивающимся в результате эндотоксиновой толерантности мононуклеарных фагоцитов, уменьшения количества клеток-эффекторов и эффекторных молекул, блокады активационного и эффекторного потенциалов антигенраспознающих клеток, а также лимфоцитов, относящихся к специфичным к антигену клонам клеток (Козлов, 2006; Руднов, 2000; Ayala et al., 2000).

Одним из частных проявлений септического шока или наиболее частым осложнением сепсиса, вызванного грамотрицательной флорой является ДВС-синдром (Baglin, 1996; Gando, et al., 1996). Пусковым фактором системной активации свертывания при сепсисе является ЛПС (эндотоксин) (Levi et al., 2003). ДВС-синдром развивается при сепсисе как компенсаторная реакция, цель которой — восстановление целостности эндотелиального слоя и замещение его дефектов, появившихся в результате ЛПС-индуцированного повреждения сосудов. По данным ряда авторов ДВС-синдром развивался у 30-50% больных сепсисом, вызванным грамотрицательными микроорганизмами (Baglin, 1996; Gando et al., 1996).

Центральная роль в процессах свертывания крови и развитии ДВС-синдрома принадлежит тканевому фактору (TF), который вырабатывается активированными макрофагами, нейтрофилами и эндотелиальными клетками (Giesen et al. 1996; Osterud, 1998; Pawlinski et al. 2004). Взаимо-

действие ЛПС с клетками макроорганизма приводит к их активации и усилению экспрессии TF, который связывает и активирует фактор УП, комплекс TF – факторУПа активирует прямо или опосредованно фактор X. В свою очередь фактор Xa вместе с фактором Y превращает протромбин (фактор II) в тромбин (фактор IIa). Одновременно развиваются нарушения в системе физиологических антикоагулянтов (низкий уровень АТ III, нарушение функций протеина С, недостаток TFPI (ингибитора тканевого фактора) и угнетение системы фибринолиза. Вследствие этого не происходит адекватного удаления внутрососудистых отложений фибрина, наблюдается избыточное отложение продуктов деградации фибрина (ПДФ). Это в свою очередь может привести к тромбозам мелких и средних сосудов и ПОН.

Лечение сепсиса является комплексным, патогенетическим, зависит от его варианта и стадии, но прежде всего оно должно быть направлено на ликвидацию инфекции (этиотропная терапия) и ДВС-синдрома (Коэн, 2002). Обязательные составляющие терапии сепсиса — иммунокоррекция и коррекция нарушений в системе гемостаза.

Актуальной проблемой лечения больных с эндотоксинемией является поиск препаратов, снижающих негативное влияние эндотоксина на организм и повышающих резистентность организма к токсическому воздействию ЛПС, т.е. оказывающих стимулирующее влияние на факторы врожденного иммунитета.

Несмотря на то, что современная медицина имеет широкий арсенал препаратов, в т.ч. ПС природы, направленных на различные звенья иммунологических нарушений и изменений гемостаза, далеко не все их структурные особенности выяснены с достаточной определенностью, а их применение не лишено побочных эффектов, что необходимо учитывать при выборе тактики терапии.

Особого внимания среди полисахаридов природного происхождения заслуживают сульфатированные полисахариды, выделенные из морских животных, водорослей, микроводорослей, обладающие широким спектром фармакологической активности, в том числе способностью к коррекции нарушений при эндотоксинемии или потенциальной активностью в качестве препаратов для терапии сепсиса, вызванного грамотрицательными микроорганизмами.

На сегодняшний день подтверждена таковая активность природных сульфатированных полисахаридов - гепарина, каррагинана, фукоидана.

Гепарин — сульфатированный кислый мукополисахарид, состоящий из 1→4 - связанного глюкозамина и остатков глюкуроновой кислоты, этерифицированных серной кислотой, не имеющий разветвленного по-

лисахаридного скелета (Desay, 2004). Область клинического применения обычного гепарина как антикоагулянтного и антитромботического средства довольно широка: венозные тромбозы, тромбоэмболия легочной артерии, ДВС-синдром, нестабильная стенокардия, острый инфаркт, ишемический инсульт (Васильев и др., 1997; Гитун, 2004; Головачева и др., 2009; Ryan et al., 1996). С профилактической целью препараты гепарина используют при хирургических вмешательствах, при лечении пациентов со злокачественными новообразованиями, при недостаточности кровообращения, для профилактики свертывания крови при использовании экстракорпорального кровообращения (Бунин, 2006; Гитун, 2004; Ryan et al., 1996).

Широкому применению гепарина способствует его иммуностимулирующая и противовоспалительная активность (Derhaschnig et al., 2003; Heinzelmann, Bosshart, 2004; Robertson, 2006), антисклеротическое (снижение уровня сахара, холестерина, жирных кислот) и спазмолитическое действие (Mandal et al., 2000; Gunay, Linhardt, 1999), способность стимулировать гемопоэз, усиливать выход лейкоцитов из костного мозга, усиливать пролиферацию лимфоцитов в лимфоузлах и нормализовать их уровень в крови (Gunay, Linhardt, 1999; Robertson, 2006). К положительным эффектам гепарина относится его способность тормозить рост и метастазирование опухолевых клеток (Robertson, 2007). С учетом этих видов активности гепарин используется и в комплексе лечения сепсиса и эндотоксинового шока (эндотоксинемии).

В последнее время развиваются новые подходы к лечению клинических синдромов, обусловленных эндотоксинами, в частности с использованием веществ, способных подавлять индуцированную липополисахаридом гиперэкспрессию провоспалительных цитокинов. Этот эффект реализуется за счет образования макромолекулярных комплексов с ЛПС. Токсический центр молекулы ЛПС липид А представляет собой потенциальную мишень для соединений с антиэндотоксической активностью (Brandenburg and Weise, 2004). Такими свойствами обладают каррагинаны. Каррагинаны, сульфатированные полисахариды, которые встречаются только в красных морских водорослях, не имеют аналогий среди других растительных полисахаридов и находят широкое применение как в фармацевтической, так и пищевой промышленности. Каррагинаны являются линейными неразветвленными сульфатированными полисахаридами, в которых остатки галактозы связаны чередующимися α -(1→3) и β -(1→4) связями. Звенья галактозы, связанные β -(1→4) в этой общей структуре, часто выступают как 3,6-ангидро-D-галактоза, и в некоторых или всех звеньях галактозы могут присутствовать группы сульфатного сложного эфира.

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* установлено, что каррагинаны способны взаимодействовать с ЛПС грамотрицательных бактерий, изменяя надмолекулярную организацию, что способствует снижению их токсичности (Ермак и др., 2006b; Коннова, 2007).

Использование каррагинанов в качестве препаратов вспомогательной терапии при лечении ряда заболеваний, в том числе сопровождающихся эндотоксинемией, обусловлено также наличием у них иммуномодулирующей активности и нормализующим влиянием на систему гемостаза (Белокриницкая, 2003; Ермак и др., 2006а, бс; Полякова и др., 2005; Соловьева и др., 2010; Сонина, 2007; Хасина и др., 2007). Экспериментально установлено повышение под влиянием каррагинана показателей врожденного иммунитета при эндотоксинемии, индуцированной липополисахаридом *Escherichia coli*. В этих экспериментах также установлено, что каррагинан препятствовал инволюции тимуса, гипертрофии надпочечников, изменению уровня тиреоидных гормонов и кортикостерона в сыворотке крови, активации гликогенолиза, гликолиза, перекисидации липидов в печени животных (Хасина и др., 2007).

В условиях экспериментальной эндотоксинемии и в клинических условиях (у больных пищевыми токсико-инфекциями) показана возможность коррекции функционального состояния тромбоцитов человека с помощью каррагинана (Полякова и др., 2005).

Следует также отметить, что каррагинаны обладают высокой способностью связывать и удерживать ионы металлов, что имеет перспективы использования каррагинанов в составе энтеросорбентов при отравлениях или заболеваниях, сопровождающихся эндотоксикозом (Khotimchenko et al., 2010).

Фукоиданы, матричные сульфатированные разветвленные гетерополисахариды клеточных стенок (сульфатированные фуканы) (Berteau, Mulloy, 2003). Фукоиданы нетоксичны и обладают разносторонней фармакологической активностью, в т.ч. являются эффективными иммуномодуляторами, оказывающими воздействие на факторы врожденного и приобретенного иммунитета, что представляет значительный интерес для их клинического использования при лечении эндотоксемии и сепсиса. Большие возможности с точки зрения использования фукоиданов для коррекции нарушений при эндотоксинемии открывает их противовоспалительная и антиоксидантная активность, способность оказывать цитопротекторное действие на дендритные клетки, как важнейшие эффекторы врожденного иммунитета, а также антикоагулянтная активность и др. (Berteau, Mulloy, 2003; Cumashi et al., 2007; Li et al., 2008; Kim, Joo, 2008; Costa et al., 2011).

Несмотря на огромное количество литературных источников по иссле-

дованию биологической активности и механизмов действия фукоиданов, нами обнаружена лишь единичная работа, посвященная применению фукоидана при экспериментальной эндотоксинемии, датированная 2011 годом (Ko, Joo, 2011). Согласно данным этих авторов, профилактическое введение фукоидана из *F. vesiculosus* способствует увеличению выживаемости животных, получивших летальную дозу ЛПС *E.coli*, что рассматривается как воспроизведение модели сепсиса. Исследуя механизмы действия, авторы установили, что фукоидан оказывает цитопротекторное действие, способствуя восстановлению популяции дендритных клеток, а также увеличению экспрессии антиапоптотических молекул Bcl-2, Bcl-xL, cIAP-1 на спленоцитах, в которых под влиянием ЛПС усиливались процессы апоптоза.

Таким образом, сульфатированные полисахариды природного происхождения обладают широким спектром биологической активности, в том числе способностью оказывать стимулирующее действие на факторы врожденного и приобретенного иммунитета макроорганизма, подверженного воздействию бактериального эндотоксина, в связи с чем имеют перспективы применения при лечении сепсиса и эндотоксинемии. В целом, анализ данных литературы свидетельствует, что исследования по применению фукоиданов при эндотоксинемии и сепсисе находятся на начальном этапе, а полученные нами и представленные ниже результаты, демонстрирующие возможности применения фукоидана из *F. evanescens* для коррекции нарушений при эндотоксинемии, можно считать приоритетными.

Наши эксперименты были проведены на модели экспериментальной эндотоксинемии, которая является наиболее подходящей для изучения механизмов воспаления и патологии гемостаза, а кроме того, служит наилучшей моделью сепсиса (Гилева и др., 2006; Fink, Heard, 1990).

Эндотоксинемию воспроизводили путем внутрибрюшинного введения мышам линии BALB/c ЛПС *Y. pseudotuberculosis* в дозе $6,25 \pm 0,5$ мг/кг, составляющей LD₁₀₀, что обусловлено также нашим интересом к исследованию роли этого ЛПС в иммунопатогенезе псевдотуберкулезной инфекции (Кузнецова, 1987), в частности, к индуцированным ЛПС нарушениям в системе иммунитета и гемостаза.

В наших экспериментах I группа представлена животными, которым вводили ЛПС в дозе LD₁₀₀; II группа — мыши, которым вводили фукоидан по лечебной схеме (3-хкратно подкожно в дозе 5 мг/кг после инъекции ЛПС); III группа — животные, которым вводили фукоидан по профилактической схеме 10-кратно подкожно до введения ЛПС; IV группа — получившие фукоидан перорально в течение 21 суток, а затем ЛПС; контролем служила V группа — животные, которым вводили 0,85% NaCl.

Через 15 минут после введения ЛПС у животных (I группа) наблюдались явления интоксикации: адинамия (вялость, малоподвижность), одышка, отказ от воды и пищи, шерсть становилась влажной и взъерошенной. По истечении 2 часов у животных повышалась температура тела, присоединялась диарея. Эти признаки свидетельствуют о развитии системного воспалительного ответа, обусловленного запуском каскада провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления (Игонин и др., 2004; Hack et al., 1999; Levi, Cate, 1999). Через 3-4 часа клинические симптомы интоксикации достигали максимума, затем развивались параличи и парезы конечностей, к концу 1-х - началу 2-х суток все животные погибали. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) животных этой группы составила $27,1 \pm 2,2$ ч.

При введении мышам фукоидана по лечебной схеме (II группа) СПЖ повышалась до $43,2 \pm 3,4$ ч ($p=0,012$) по сравнению с I группой, однако все животные также погибали. При профилактическом 10-кратном парентеральном применении фукоидана (III группа) СПЖ возрастала до $52,8 \pm 4,3$ ч ($p=0,01$), выживаемость в этой группе составила $18,9 \pm 1,2\%$; пероральное в течение 21 суток до инъекции ЛПС введение фукоидана (IV группа) обеспечивало $24,4 \pm 4,3\%$ выживаемости при СПЖ $57,6 \pm 3,6$ ч ($p=0,002$) (рис.12.1). Полученные результаты свидетельствуют, что профилактическое введение фукоидана обеспечивает повышение выживаемости животных при экспериментальной эндотоксемии.

Исследование динамики провоспалительных цитокинов показало значительное повышение ($p=0,000$) концентрации TNF α и IL-1 α в сыворотке крови мышей через 2 часа после введения ЛПС (I группа) по сравнению

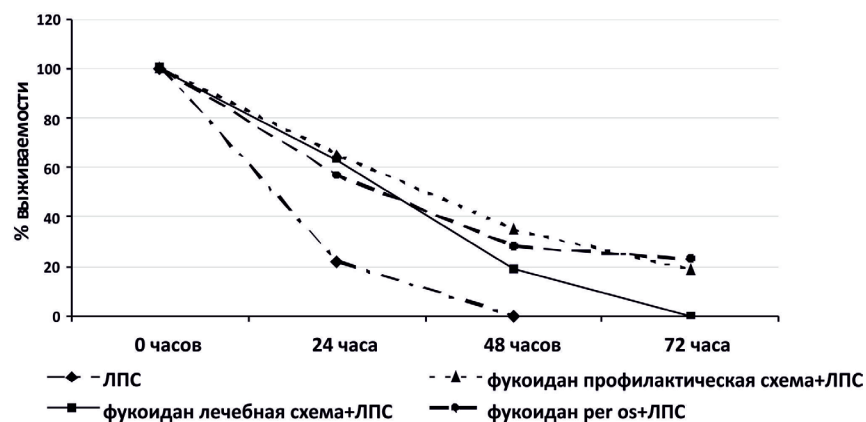


Рис. 12.1. Динамика выживаемости мышей при экспериментальной ЛПС-индуцированной эндотоксемии под влиянием фукоидана. По оси ординат — показатели выживаемости (%); по оси абсцисс — время после введения мышам ЛПС (ч)

с контролем. Через 4 часа концентрации этих цитокинов снижались и к 24 час. постепенно приближались к показателям контрольной группы. Под влиянием фукоидана (III группа) концентрация TNF α и IL-1 α на протяжении всего периода исследования была ниже, чем в I группе (рис. 12.2 А). Корректирующее влияние фукоидана на уровень TNF α и IL-1 α на ранних сроках развития эндотоксинемии (2—4 часа) особенно важно, поскольку на эти сроки приходится максимум клинических проявлений.

Динамика IL-6 имела иную закономерность у животных этой группы, приобретая максимальные показатели через 8 час с последующим снижением, его концентрация также значительно превышала показатели в группе интактных животных. Под влиянием фукоидана выявлены более низкие значения IL-6 по сравнению с таковыми в I группе (рис. 12.2 Б).

Таким образом, профилактическое введение фукоидана животным с экспериментальной эндотоксинемией, индуцированной введением летальной дозы ЛПС псевдотуберкулезного микроба, приводит к ингибированию

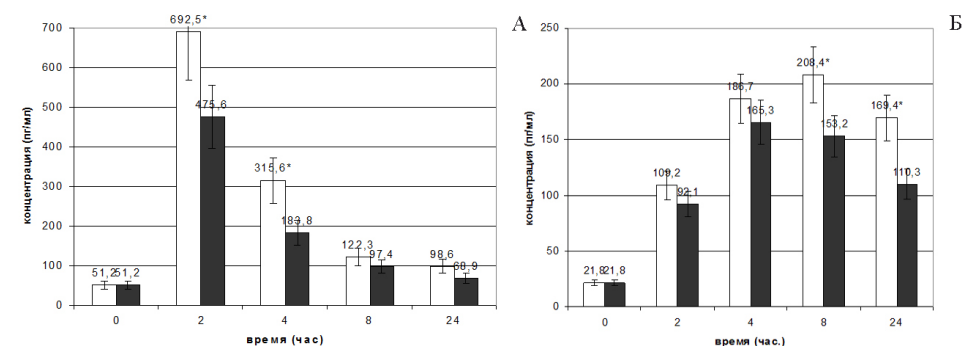


Рис. 12.2. Динамика уровня TNF α (А) и IL-6 (Б) в сыворотке крови мышей BALB/c (светлые столбики — экспериментальная эндотоксинемия; темные столбики — то же под влиянием фукоидана).

Примечание: n=6; * — различия статистически значимы ($p \leq 0,05$).

повышенного уровня провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 α и IL-6).

Результаты исследования показателей системы гемостаза у мышей свидетельствуют, что экспериментальная эндотоксинемия приводила к развитию выраженной гиперкоагуляции на ранних этапах (3—4 часа после введения ЛПС), что проявлялось увеличением общего коагулянтного потенциала плазмы и выражалось в сокращении по сравнению с исходным времени свертывания крови в базовых коагуляционных тестах, а также к угнетению фибринолиза (табл. 12.2). Эти признаки характерны для начальной стадии ДВС-синдрома (Pawlinski et al., 2004; Levi et al., 2003). Введение животным фукоидана по лечебной схеме (II группа) способствовало купированию явлений гиперкоагуляции, о чем свидетельствуют по-

казатели АПТВ- и ТВ-тестов, а также активации ФА крови, что, вероятно, связано с наличием у фукоидана антикоагулянтной и фибринолитической активности (Кузнецова и др., 2003), однако восстановления показателей свертывания крови до уровня контроля (У группа) не наблюдалось (табл. 12.1). При профилактическом введении фукоидана (III группа) выявлены гипокоагуляционные сдвиги, выражающиеся в удлинении времени свертывания крови по сравнению с I группой и по сравнению с контролем ($p=0,000$). Эти процессы сопровождалась активацией по сравнению с I группой ФА ($p=0,001$) и восстановлением уровня ФГ ($p=0,004$), которые приближались к уровню контроля (У группа) (табл. 12.1).

Таблица 12.2

Влияние фукоидана на показатели системы гемостаза через 4 часа после ЛПС-индуцированной эндотоксинемии

Показатели гемостаза (M±m)	Группа животных			
	ЛПС (I)	Фукоидан (II)	Фукоидан (III)	Контроль (V)
АПТВ (сек.)	25,0±2,0	38,5±1,9*	75,6±6,5*	47,4±2,6*
		$p(II - I) = 0,001$	$p(III - I) = 0,000$	$p(V - I) = 0,000$
		$p(II - V) = 0,025$	$p(III - V) = 0,000$	
ПВ (сек.)	11,6±0,9	14,0±0,8	23,2±2,4*	16,8±2,6
		$p(II - I) = 0,081$	$p(III - I) = 0,000$	$p(V - I) = 0,095$
		$p(II - V) = 0,331$	$p(III - V) = 0,108$	
ТВ (сек.)	12,8±0,4	15,7±1,0*	67,8±4,7*	18,6±0,6*
		$p(II - I) = 0,027$	$p(III - I) = 0,000$	$p(V - I) = 0,000$
		$p(II - V) = 0,028$	$p(III - V) = 0,000$	
ФА (мин.)	533±28	430±29*	350±30*	310±32*
		$p(II - I) = 0,034$	$p(III - I) = 0,001$	$p(V - I) = 0,001$
		$p(II - V) = 0,024$	$p(III - V) = 0,388$	
ФГ (г/л)	6,1±0,4	4,8±0,2*	4,4±0,2*	4,1±0,25*
		$p(II - I) = 0,02$	$p(III - I) = 0,004$	$p(V - I) = 0,003$
		$p(II - V) = 0,06$	$p(III - V) = 0,342$	

Примечание: показатели гемостаза M±m; p – значимость различий при сравнении показателей в разных группах; * – различия статистически значимы по отношению к I группе ($p \leq 0,05$); n=5; использован параметрический t-критерий Стьюдента для независимых выборок.

При сопоставлении динамики показателей свертывания и уровня сывороточных цитокинов (TNFα и IL-1α) у мышей, получивших ЛПС, мы отметили, что усиление продукции этих цитокинов предшествовало нарастанию гиперкоагуляции, что согласуется с положением о центральной роли провоспалительных цитокинов (в частности их избыточной продукции) в процессах гиперкоагуляции и ингибировании фибринолиза при сепсисе и эндотоксиновом шоке (Levi et al., 1997; Kerr et al., 2001). К концу первых суток после введения ЛПС, наблюдалось увеличение времени свертывания крови, активация ФА и снижение уровня ФГ, что отражает развитие гипокоагуляционных изменений в результате потребления факторов свертывания крови. Концентрация TNFα и IL-1α к этому сроку значительно снижалась, что свидетельствует об ослаблении цитокинового каскада, индуцированного ЛПС. Именно на этапе гиперкоагуляции эффективным является применение антикоагулянтов (гепарина, лепирудина, гирудина и др.) и показано в ряде экспериментальных работ (Pernerstorfer et al. 2000; Pawlinski et al., 2004). Под влиянием фукоидана из *F. evanescens* наблюдалось снижение процессов гиперкоагуляции, что связано с его антикоагулянтной активностью, и ингибирование повышенного уровня TNFα, IL-1α, IL-6. Последнее является особенно важным в механизмах действия фукоидана, поскольку терапевтическая стратегия при лечении сепсиса и эндотоксинового шока направлена против элементов гипервоспалительного каскада, в частности, против этих цитокинов. Реализуя отмеченные механизмы, фукоидан способствует сглаживанию клинических проявлений эндотоксикоза, снижению явлений гиперкоагуляции и других признаков ДВС-синдрома, а в итоге способствует повышению резистентности мышей к токсическому действию ЛПС.

Подводя итоги проделанных экспериментов можно заключить, что профилактическое введение фукоидана (как парентеральное, так и пероральное) обеспечивает повышение резистентности мышей к токсическому действию ЛПС. Фукоидан способен эффективно регулировать состояние системы иммунитета и гемостаза при экспериментальной эндотоксинемии, а при условии профилактического введения – ослаблять течение ДВС-синдрома.

При эндотоксинемии, как представлено выше, развиваются нарушения микроциркуляции, гипоксия и выраженная дисфункция органов и систем организма, формируется ПОН. Для ПОН характерно поражение различных органов и тканей организма медиаторами и другими факторами альтерации с преобладанием симптомов той или иной органной дисфункции (легочной, сердечной, почечной, гепато-билиарной и др.). Без адекватного лечения ПОН неуклонно прогрессирует и приводит к

летальному исходу (Игонин, 2004; Козлов, 2006; Levi, Cate, 1999).

Нами также исследовано влияние фукоидана на состояние внутренних органов и микроциркуляторного русла мышцей на модели эндотоксинемии, индуцированной введением ЛПС *Y. pseudotuberculosis*.

С этой целью проведено патоморфологическое исследование органов, относящихся при эндотоксинемии к органам-мишеням или «шоковым органам»: легкие, печень, почки, сердце. Забор органов производили в динамике через 4, 7, 17 и 24 часа после инъекции ЛПС.

Первоначально была изучена микроскопическая структура этих органов у мышцей, которым вводили только фукоидан парентерально в течение 2-х недель. Морфология легких, печени, почек и сердца у животных соответствовала норме, т.е. не отличалась от таковой у интактных животных.

При введении мышцам ЛПС в летальной дозе уже через 4 ч в печени обнаружено полнокровие преимущественно центральных вен (терминальных печеночных венул) и сосудов портальных трактов с наличием локальных деструктивных изменений сосудистой стенки (рис. 12.3 а). В просвете сосудов наблюдался эритростаз с примесью полиморфноядерных лейкоцитов, в некоторых сосудах видна агрегация эритроцитов и нитей фибрина с сепарацией плазмы и образованием гомогенной эозинофильной массы. В печеночной паренхиме вблизи сосудов встречались немногочисленные некротические очажки, чаще центрилобулярные, иногда в виде типичных псевдотуберкулезных очажков с кариорексисом в центре. В почках через 4 ч отмечены микроциркуляторные изменения в виде полнокровия сосудов и деструкции их стенки, мелких диапедезных кровоизлияний, а также полнокровие и серозное пропитывание почечных клубочков, часть из которых находилась в спавшемся состоянии (рис. 12.3в). В легких на начальной стадии патологического процесса, вызванного ЛПС, просвет сосудов микроциркуляторного русла и большей части альвеол был заполнен эозинофильной массой, в просвете некоторых сосудов и в периваскулярном пространстве также отмечались лейкоциты с примесью фибрина (рис. 12.3 д).

В последующий период наблюдения (через 8—17 ч) патоморфологическая картина в печени, почках, легких характеризовалась усилением гемоциркуляторных нарушений с развитием фибриноидного набухания стенки сосудов, появлением деструктивно-воспалительных изменений в паренхиме органов преимущественно в околососудистом пространстве.

Через 24 ч после введения ЛПС в печени на фоне сосудистых изменений встречались типичные для псевдотуберкулеза некротические очажки с наличием в центре мелкозернистого детрита, многочисленные мелкие гранулемы без кариорексиса центральной зоны, наблюдались фибрино-

идный некроз стенки сосудов портальных трактов и периваскулярная воспалительная реакция. В почках сохранялись явления некротического нефроза с преимущественным повреждением проксимальных и дистальных извитых канальцев в сочетании с деструктивными изменениями почечных клубочков. В корковом слое встречались округлые конгломераты с положительной окраской на фибрин, образованные вследствие фибриноидного некроза капилляров почечных клубочков. В легких обнаруживались выраженные некротические изменения стенки сосудов микроциркуляторного русла с наличием в их просвете конгломератов, дающих положительную окраску на фибрин, а также периваскулярной полиморфноклеточной инфильтрации (рис. 12.3 б, г, е).

В целом патоморфологическое исследование органов-мишеней при эндотоксинемии подтверждает фазный характер изменений показателей системы гемостаза в соответствии со стадиями развития ДВС-синдрома.

Так, в первые часы после введения ЛПС морфологическими признаками гиперкоагуляции (1-ой стадии ДВС-синдрома) являются внутрисосудистая агрегация тромбоцитов, эритроцитов и развитие сладж-феномена (необратимой агрегации эритроцитов), образование нитей фибрина. Результаты исследования органов животных через 8 ч можно характеризовать как развитие переходной, 2-ой стадии ДВС-синдрома с нарастающей коагулопатией потребления и тромбоцитопенией, что проявлялось удлинением времени свертывания крови, снижением уровня фибриногена и соответствующими патоморфологическими изменениями в органах-мишенях, выражающимися набуханием и десквамацией эндотелия сосудов, плазматическим пропитыванием, фибриноидным набуханием и фибриноидным некрозом их стенки. Через 24 ч отмечено удлинение времени свертывания крови по сравнению с таковым в начальный период эндотоксинемии, снижение уровня фибриногена, что соответствует гипокоагуляционной стадии ДВС-синдрома. Полученные на этом сроке патоморфологические данные характеризуются преимущественно микроциркуляторными расстройствами в виде агрегации и сладжирования форменных элементов крови с сепарацией плазмы, микротромбообразованием, что приводило к дистрофическим и некротическим изменениям клеток паренхиматозных органов. Последняя стадия ДВС-синдрома — исход и осложнений. На этой стадии формируется полиорганная патология, чаще всего «шоковое» легкое, печень, почка. К концу срока исследования наблюдались многочисленные очаги некроза в органах, что приводило к гибели животных, получивших летальную дозу ЛПС.

Таким образом, патоморфологическими проявлениями ЛПС-индуцированной эндотоксинемии являются «сладж-феномен» эри-

троцитов в сосудах микроциркуляторного русла, гемоциркуляторные расстройства, наличие микротромбов, повышенная проницаемость и деструкция эндотелия сосудов, а также дистрофически-некротические изменения клеток паренхиматозных органов, что является признаками ДВС-синдрома. Эти изменения, нарастающие пропорционально длительности патологического процесса, обусловлены расстройством микроциркуляции и развитием вторичных, связанных с нарушением кровообращения, повреждений органов, а возможно, и первичных повреждений за счет прямого токсического воздействия ЛПС.

Далее нами была изучена микроскопическая структура органов животных, получивших фукоидан парентерально в течение 2-х недель до введения ЛПС (рис. 13.4). На срезах печени через 4 часа наблюдалось умеренное расширение внутридольковых и междольковых сосудов без выраженного полнокровия. Деструктивных изменений эндотелия сосудов и гепатоцитов не выявлено. Вместе с тем имелись очаговые изменения паренхимы в виде зернистой дистрофии и вариабельности размеров гепатоцитов, связанной, скорее всего, с пикнозом части клеток (рис. 12.4 а, б). В почках отмечено умеренное полнокровие сосудистых клубочков (мальпигиевых телец), в части извитых канальцев зернистая дистрофия эпителиоцитов и небольшие скопления эритроцитов в их просвете. В сердце выявлено полнокровие сосудов миокарда. Исследование органов животных в динамике показало, что в печени, почках, легких в основном сохранилась целостность эндотелиальной выстилки сосудов, в их просвете не обнаружено значительных отложений фибрина. К концу наблюдаемого периода (через 24 часа) в печени обнаружена мозаичность рисунка вследствие дистрофических и некробиотических изменений больших участков паренхимы. В этих участках наблюдалась зернистая дистрофия и некроз гепатоцитов, было нарушено строение печеночных балок. Изредка выявлялись двуядерные гепатоциты (1-2 в поле зрения), что указывает на замедление регенераторно-репаративных процессов. Об этом же свидетельствует отсутствие реакции со стороны клеток Купфера (звездчатых эндотелиоцитов). Встречались сосуды, в которых имелось фибриноидное набухание и повреждение эндотелия (рис. 13.4 в, г). В легких имело место умеренно выраженное полнокровие сосудов с наличием в их просвете эритроцитов и/или эозинофильной хлопьевидной массы с положительной окраской на фибрин. В почках в отдельных клубочках коркового вещества отмечались тромбоз и фибриноидный некроз капилляров, дистрофические и некротические изменения эпителия извитых канальцев. Изменения канальцевого эпителия носили распространенный характер с деструкцией у части животных более половины клеток. В целом степень нарушений микроциркуляции и дистрофически-некротических

изменений органов была менее выражена по сравнению с животными, которым фукоидан не вводили.

У животных, получивших фукоидан *per os* в дозе 50 мг/кг в течение 3-х недель до инъекции ЛПС (по профилактической схеме) через 4 часа после введения ЛПС в печени обнаружена распространенная резко выраженная сосудистая реакция в виде полнокровия как центральных вен долек и сосудов портальных трактов, так и синусоидных капилляров, однако по сравнению с интактным контролем, отчетливого повреждения эндотелия сосудов не выявлено. Просвет сосудов заполнен эритроцитами и/или эозинофильной массой, иногда с примесью единичных лейкоцитов. Эндотелиальная выстилка сосудов не нарушена, явлений эритродиapedеза и плазморреи не отмечается. Лишь в отдельных сосудах наблюдается очаговая деструкция эндотелия без образования диapedезных кровоизлияний вокруг них. Вместе с тем, синусоидные капилляры печеночных долек инъецированы эритроцитами. Вокруг некоторых сосудов обнаружена рыхлая полиморфноклеточная инфильтрация в основном за счет мононуклеарных клеток и клеток Купфера. В печеночных дольках вокруг центральной вены нередко видна зона измененных гепатоцитов в виде зернистой или эозинофильной дистрофии и в меньшей степени некроза. К 24 часам интенсивность патологических изменений внутренних органов у животных этой группы, была значительно ниже, чем у мышей, которые не получали фукоидан (рис. 12.4 д, е).

Результаты проведенных исследований показали, что клинико-морфологические проявления бактериальной эндотоксинемии, вызванной внутрибрюшинным введением ЛПС *Y. pseudotuberculosis*, менее выражены у животных, получивших фукоидан. При этом, профилактическое применение фукоидана было более эффективным при его парентеральном введении по сравнению с пероральным. Введение фукоидана способствует снижению степени микроциркуляторных нарушений и вторичных дистрофически-деструктивных изменений в печени, почках, легких. Т.е., нами выявлено нормализующее влияние фукоидана на состояние паренхиматозных органов мышей при эндотоксинемии. Тем не менее, на фоне применения фукоидана сохранялись микроциркуляторные нарушения в виде остаточных признаков ДВС-синдрома (в просветах сосудов органов-мишеней выявляются агрегаты и сладж-феномен форменных элементов, расслаивание крови).

Таким образом, реализация основных принципов лечения эндотоксинемии с учетом обязательных его составляющих (иммунокоррекции и коррекции нарушений в системе гемостаза), возможна путем применения фукоидана (сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *F. evanescens*).

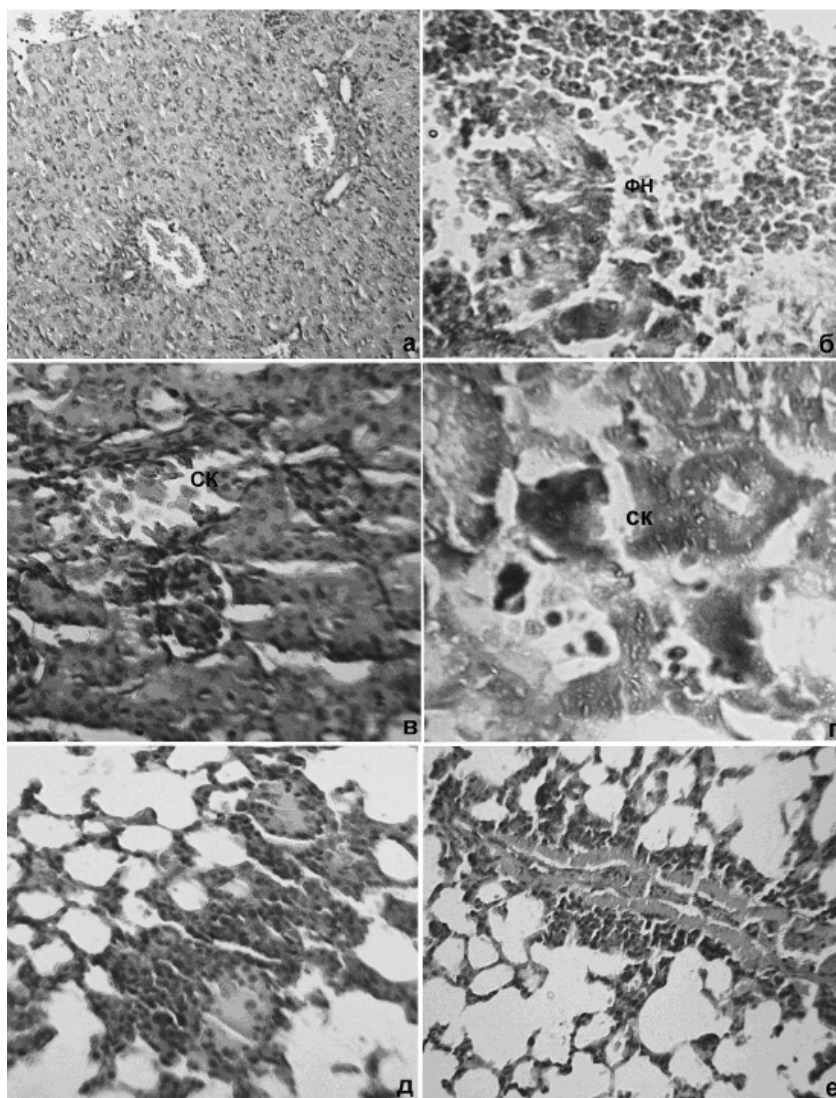


Рис. 12.3. Патогистологические изменения в органах-мишенях мышей после введения ЛПС *Y. pseudotuberculosis*: печень — резкое полнокровие сосуда портального тракта с набуханием и локальной деструкцией его стенки, 4 ч. x100, окраска гематоксилин эозином (а) и участок фибриноидного некроза (ФН) стенки сосуда портального тракта с перифокальной воспалительной реакцией, 24 ч. x200, окраска по Шуенинову (б); почка — деструктивно-воспалительные изменения в корковом слое, некроз эпителия проксимальных извитых канальцев, 4 ч. x200, окраска гематоксилин эозином (в) и фибриноидный некроз сосудистых клубочков (СК), 24 ч. x200, окраска по Шуенинову (г); легкие — эозинофильная масса, скопления лейкоцитов в просвете сосудов, 4 ч x100, окраска гематоксилин эозином (д) и фибриноидный некроз стенки сосуда, периваскулярная полиморфноклеточная инфильтрация, 24 ч x200, окраска гематоксилин эозином (е)

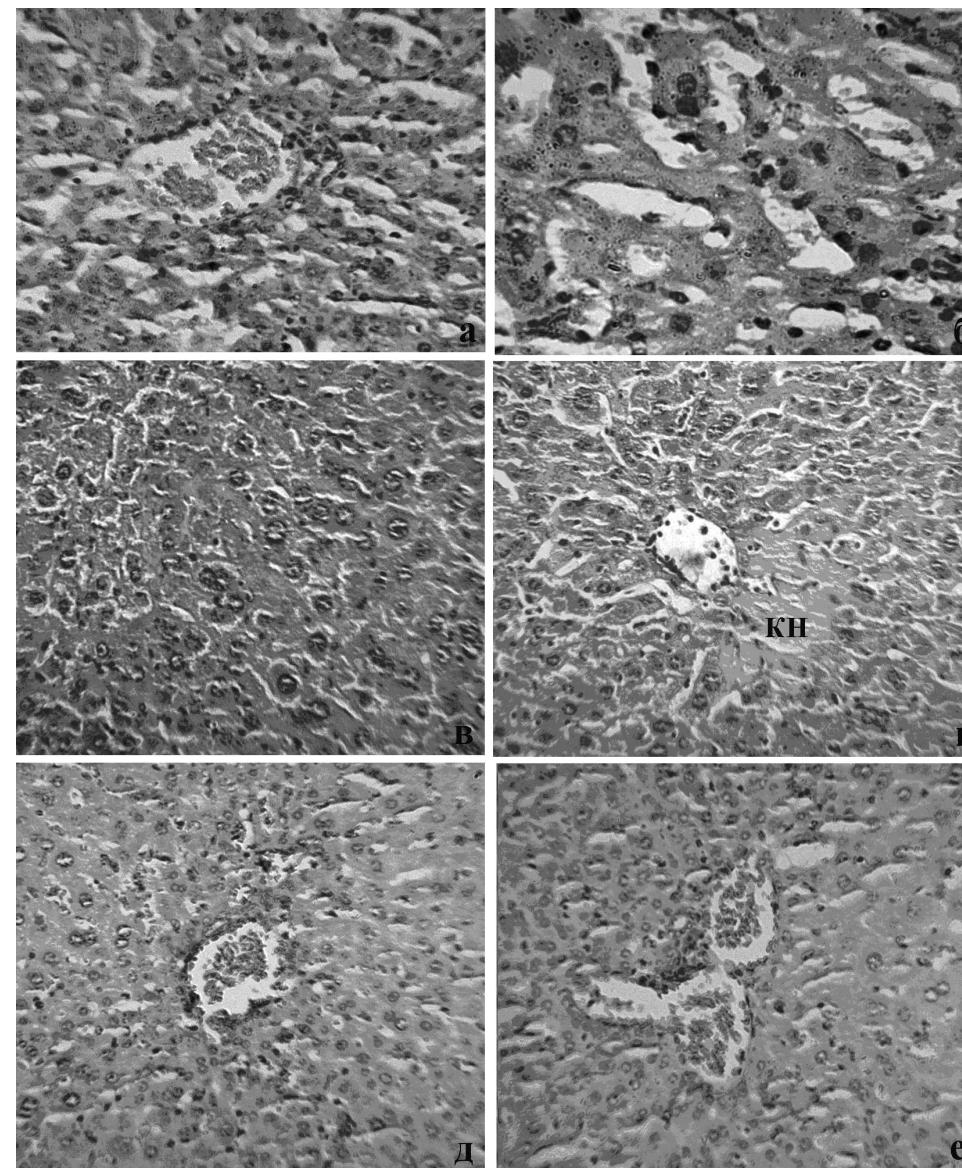


Рис. 12.4. Патогистологические изменения у животных, получивших фукоидан парентерально до введения ЛПС: а) 4: ч в печени сохранена структура эндотелия сосудов и гепатоцитов; б) 4: зернистая дистрофия гепатоцитов, очажок пикноза клеток; в) 24 ч: участок некробиоза гепатоцитов с дисконкомплексацией паренхимы; г) клиновидный некроз (КН) вокруг центральной вены печеночной дольки; у получивших фукоидан перорально до введения ЛПС: д) полнокровие сосудов печени без повреждения эндотелия, эритроциты в просвете синусоидных капилляров; е) рыхлая полиморфноклеточная инфильтрация вокруг сосудов печени. x200

Глава 13. Противоопухолевое действие сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей

В последние десятилетия достигнуты значительные успехи в лечении таких форм злокачественных новообразований, как рак кожи, острые лейкозы, ходжкинские и неходжкинские лимфомы, рак молочной железы, яичка. Однако в отношении наиболее распространенных неоплазий человека — рака легкого, желудка, яичников, поджелудочной железы, кишечника — больших успехов пока нет, несмотря на совершенствование аппаратуры, методов лучевой и химиотерапии, а также на достижения хирургической техники. К настоящему времени стала очевидной необходимость комплексного подхода к терапии опухолей, базирующегося на фундаментальных знаниях особенностей метаболизма опухолевой клетки и подразумевающего комбинацию этих методов с гормонотерапией, иммунотерапией и биотерапией. Последний метод предполагает не только прямое цитотоксическое воздействие на опухолевые клетки, но и влияние на компоненты системы противоопухолевой защиты, включая блокирование различных этапов развития опухоли для предупреждения появления метастазов и возникновения вторичных злокачественных новообразований.

В связи с этим важное направление в современной экспериментальной фармакологии связано с поиском и разработкой природных лекарственных средств, направленных на профилактику и лечение злокачественных новообразований. Перспективным источником для них являются морские гидробионты, в частности, водоросли (Teas, 1983; Yang, 2009) и получаемые из них углеводные биополимеры, в первую очередь, сульфатированные полисахариды – фукоиданы (Запорожец, 2006; 2007; Усов, 2009; Хотимченко, 2010; Pomin, 2008; D'Ayala, 2008; Collen, 2009).

Несмотря на то, что первые публикации о биологической активности фукоиданов относятся к концу прошлого столетия (Usui, 1980), их антиопухолевые свойства начали интенсивно исследоваться относительно недавно. Сульфатированные полисахариды обладают выраженным противоопухолевым действием, проявляя антипролиферативные, антиметастатические, проапоптотические и антиангиогенные свойства (Kawamoto, 2006; Cumashi, 2007; Voорathy, 2010). Противоопухолевые свойства сульфатированных полисахаридов обусловлены их способностью связываться с широким спектром белков, таких как факторы роста и молекулы клеточной адгезии, что может влиять на пролиферацию и дифференцировку, апоптоз и метастазирование опухолевых клеток. Кроме того, сульфатированные

полисахариды могут стимулировать действие факторов врожденного и адаптивного иммунного ответа на опухолевые клетки.

Антипролиферативные эффекты СПС

Достижения генетики и молекулярной биологии последних десятилетий оказали огромное влияние на понимание природы инициализации и прогрессии злокачественных образований. Доказательство связи процессов онкогенной трансформации клетки с нарушениями механизмов пролиферации и апоптоза открыло принципиально новые возможности их фармакологической коррекции, предполагающие действие на уровне мембран, цитоплазмы и ядра клеток-мишеней и включающие модуляцию сигнальных каскадов как на белковом, так и транскрипционном уровне.

Антипролиферативное действие фукоиданов, направленное на подавление синтеза предшественников и репликации ДНК, изучалось многими авторами, начиная с 90-х годов XX века (Vischer, 1991; Ellouali, 1994; Choosawad, 2005) и продолжает исследоваться сегодня. Проллиферативные эффекты фукоидана из *Fucus evanescens* показаны на культуре клеток линии HS-Sultan лимфомы человека (Aisa, 2005), аденокарциномы желудка человека (Park, 2011) и гладкомышечных клеток (Religa, 2000). J. Hyun с соавторами (Hyun, 2009) сообщают о способности фукоидана из водоросли *F. vesiculosus* в концентрациях до 100 мкг/мл, подавлять пролиферацию клеток карциномы толстой кишки линии HCT-15 на 62%. Фукоидан из *Undaria pinnatifida* также широко используется для исследования биологического действия. Антипролиферативное действие фукоидана из *U. pinnatifida* в концентрациях больше 1000 мкг/мл наблюдали X. Liu с соавторами (Liu, 2010) на клеточной линии Hca-F. При этом в селезенке мышей, получивших фукоидан per os, наблюдалась тенденция к увеличению пролиферативной активности лимфоцитов и фагоцитарной активности макрофагов, а также повышению уровня провоспалительных цитокинов IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 и TNF α . Авторы обращают внимание на тот факт, что противоопухолевое действие фукоидана, наряду с антипролиферативной активностью, может быть обусловлено усилением клеточного и гуморального иммунитета. Также фукоидан из *U. pinnatifida* оказывал антипролиферативное действие на клетки A549 карциномы легких человека (Boo, 2011).

Рост клеток рака желудка ингибировал фукоидан из *S. okamuranus* (Jiang, 2010), при этом на здоровые клетки желудка полисахарид такого действия не оказывал (Kawamoto, 2006). Фукоидан из водоросли *A. nodosum* в экспериментах *in vitro* блокировал фазу G₁ клеточного цикла в клетках линии NSCLC (немелкоклеточная бронхолегочная карцинома человека) (Riou, 1996) клетках аденокарциномы сигмовидной кишки COLO320DM, а также

проявлял антипролиферативное действие на нормальных клетках, включая фибробласты (фибробласты почки хомячка CCL39) и клетки гладких мышц (Vischer, 1991). Нам сложно объяснить данные об антипролиферативном действии фукоиданов на нормальные клетки организма, поскольку часто исследователи используют коммерчески доступные фракции фукоиданов, содержащие полифенолы, которые могут проявлять антипролиферативное действие по отношению к нормальным клеткам.

Z. Jiang (Jiang, 2010) при исследовании влияния фукозосодержащих сульфатированных полисахаридов — аскофиллана и фукоидана, выделенных из *A. nodosum* на рост клеточных линий MDCK, Vero, PtK(1), CHO, HeLa, and XC обнаружили сильное цитотоксическое действие на клетки линии Vero и XC, в то время как другие клеточные линии были относительно устойчивы к действию полисахаридов. Противоопухолевое действие этого полисахарида в субтоксических дозах было подтверждено в опытах *in vivo* на мышцах (Riou, 1996).

В экспериментах *in vitro* на клеточной культуре HeLa убедительно доказан антипролиферативный эффект гетерополисахаридов из водоросли *Dictyopterus delicatula* (Magalhaes, 2011), дозозависимо подавляющих рост от 60% до 91,8% клеток. Выраженное антипролиферативное действие на клетки HeLa, PC3, HepG2 установлено для фракций гетерополисахаридов, из водоросли *Sargassum filipendula* содержащих фуканы и уронаны в различных соотношениях (Costa, Telles, 2011; Park, 2011).

Фукоидан из *L. japonica* в экспериментах *in vitro* ингибировал клетки гепатомы QGY 7703 в логарифмической фазе роста (Shi et al., 2009). Коммерческий фукоидан из *S. novae* ингибировал рост клеток рака молочной железы (MCF-7, MDA-MB-231), рака матки (HeLa) и фибросаркомы (HT 1080) (Zhang, 2011). Антипролиферативное действие полисахарида было связано с транслокацией цитохрома-с и активацией MAP киназ (JNK, p38 и ERK1/2). При этом не наблюдалось расщепления каспаз 7, 8 и 9 и активации PARP и Bid (Zhang, 2011). Фукоиданы из других бурых водорослей подавляли неоангиогенез, модулировали иммунные процессы, задерживали клеточный цикл и/или индуцировали апоптоз (Ye, 2005; Liu X, 2010).

В работе S. Fucahori (Fucahori, 2008) на 15 линиях опухолевых клеток человека исследовано антипролиферативное действие фукоидана из водоросли *Okinawa tozuku*. Авторы обращают внимание на избирательность действия фукоидана, подавляющего пролиферацию только 12 линий клеток. Полисахарид не оказывал действия на клетки нейробластомы и две линии карциномы яичника.

Многими исследователями установлена связь антипролиферативного эффекта фукоиданов со структурными характеристиками: моносахаридным

составом, типом связи между моносахаридными остатками, молекулярной массой и содержанием сульфатных групп (Brunner, 1998; Haroun-Bouhedja, 2000; Liu, 2000). Так, например, на клеточной линии немелкоклеточного рака легких человека A549 установлено увеличение антипролиферативного действия фукоидана из *U. pinnatifida* с уменьшением молекулярной массы от 510 кДа до 490 кДа (Boo, 2011).

В то же время в работе (Yang, 2008) показано, что при получении фукоиданов с более низкой молекулярной массой под действием кислотного гидролиза возможно частичное удаление сульфатных групп, с чем, вероятно, связано снижение антипролиферативного действия (Yang, 2008). Значение сульфатных групп в проявлении антипролиферативных свойств установлено и при изучении фукоидана, полученного из водоросли *Eisenia bicyclis*, являющегося гомогенным L-фуканом с высоким содержанием сульфатов (32,3%) (Usui, 1980) и водорастворимых полисахаридов из *Sargassum kjelmannianum* (Takahashi, 1984), тормозящих рост клеток саркомы 180 и лейкемии L-1210 (Yamamoto, 1984). Повышение степени сульфатирования фракции SKCF полисахарида из *Sargassum kjelmannianum* от 17,2% до 50% также приводило к увеличению активности по отношению к клеткам лейкемии на 26% (Takahashi, 1984).

Таким образом, как следует из приведенных материалов, фукоиданы из разных видов водорослей и на различных экспериментальных моделях проявляют выраженное антипролиферативное действие.

Проапоптотическое действие СПС. К настоящему времени доказана роль ослабления индукции запрограммированной клеточной гибели в канцерогенезе, в связи с чем высокую перспективность приобретают исследования, ориентированные на разработку индукторов апоптоза опухолевых клеток (Ярилин, 2001; Владимирская, 2002).

Индукция апоптоза в опухолевых клетках фукоиданами, осуществляемая посредством дерегуляции генов, участвующих в промотировании или ингибировании апоптотической программы, может являться одним из возможных механизмов противоопухолевой и антиметастатической активности (Yamamoto, 1984; Mayer, 1987; Itoh, 1993; Athucorala, 2009).

Противоопухолевые канцеростатические средства, активным компонентом которых являются сульфатированные фукозосодержащие полисахариды или продукты их деградации, запатентованы в качестве индукторов апоптоза (Pat. USA 6207652).

В работе Y. Aisa (Aisa, 2005) сообщается об усилении апоптоза в клетках линии HS-Sultan под действием фукоидана из *Fucus vesiculosus* (100 мкг/мл), реализуемого через митохондриальный путь с активацией каспазы-3 и связанного с уменьшением фосфорилирования митоген-активируемой

протеинкиназы ERK и гликозосенситивной киназы GSK, но не митогенактивированной киназы p38 и протеинкиназы B (Akt). При этом индукция апоптоза не была связана с L- и P-селектинами, являющимися рецепторами фукоидана, поскольку клетки HS-Sultan не экспрессируют эти рецепторы.

Фукоидан из *F. vesiculosus* (20 мкг/мл) индуцирует апоптоз в клетках опухоли толстой кишки человека HT-29 и HCT 116 через рецепторный и митохондриальный пути активации каспаз 8, 9, 7 и 3 со снижением уровня белков IAP и Mcl-1, повышением проницаемости мембран митохондрий, высвобождением цитохрома C и вторичного митохондриального активатора каспаз Smac/Diablo, а также усилением экспрессии Fas, DR5 и TRAIL (Kim, 2010; Hyun, 2009).

Индукция апоптоза фукоиданом в лейкоэмических клетках сопровождается активацией внеклеточной сигнальной регуляторной киназы (ERK) и киназы p38, а также инактивацией фосфотидил-инозитол-3-киназного (p13)/Akt сигнального пути (Jin, 2010).

Супрессивные эффекты фукоидана усиливались после химического сульфатирования его молекулы (Haroun-Bouhedja, 2000; Koyanagi, 2003; Teruya, 2005; Cho, 2011).

До настоящего времени неизлечимой болезнью взрослых людей является Т-клеточный лейкоз (ТЛВ), вызываемый вирусом HTLV-1 (Haneji, 2005). Фукоидан, выделенный из водоросли *S. osamuranus*, ингибирует рост мононуклеарных клеток периферической крови больных Т-клеточным лейкозом, и Т-лимфоцитов, инфицированных вирусом HTLV-1, но не влияет на пролиферацию мононуклеарных клеток здоровых людей. Механизм индукции апоптоза инфицированных вирусом Т-лимфоцитов связан с подавлением клеточных ингибиторов апоптоза - протеина-2 и сурвивина (Haneji, 2005). Кроме того полисахарид инициировал накопление Т-лимфоцитов в фазе G1 клеточного цикла за счет подавления циклина D2 (белка, являющегося одним из активаторов циклин-зависимых протеинкиназ (CDK) — ключевых ферментов, участвующих в регуляции клеточного цикла. Полисахарид инактивировал ядерный фактор транскрипции NF-κB и транскрипционный фактор AP-1 (activator protein-1) и ингибировал продукцию NF-κB-индуцибельного хемокина и с-с хемокинового лиганда 5. В экспериментах *in vivo* фукоидан вызывал частичное ингибирование роста опухолей HTLV-1-инфицированных клеточных линий, трансплантированных подкожно мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом. Эти результаты свидетельствуют о том, что фукоидан в перспективе может быть потенциальным терапевтическим средством для пациентов с Т-клеточным лейкозом.

Эффект фракции фукоидана (полидисперсный 1,3;1,4-α-L-фукан (47-420

kDa), содержащий 13,5% полифенолов и 18,5% белков) из *Ascophyllum nodosum* на апоптоз клеток рака кишечника человека (HCT 116), реализуемый через активацию каспаз 9 и 3 и расщепление PARP описан Foley S.A. с соавторами (Foley, 2011).

В раковых клетках молочной железы линии MCF-7 фукоидан из *S. osamuranus* вызывал апоптотическую гибель клеток по каспазо-8-зависимому пути, не оказывая влияния на нормальные клетки. Как и в других случаях, эффект был дозозависимым (Yamasaki-Miyamoto, 2009).

Апоптоз в клетках человеческой карциномы легких A549, ассоциированный с антипролиферативным действием фукоидана, наблюдали H.J. Woo с соавторами (Woo, 2011) Изменения, характерные для апоптоза – конденсация хроматина и увеличение количества диплоидных и суб-G1 гиподиплоидных клеток были сопряжены с ингибированием экспрессии белка Bcl-2, а также фосфорилированием белков p38/P13K/AT и ERK1/2 MAPK путей сигнальной трансдукции.

Фукоидан из *F. vesiculosus*, подавляющий рост клеток аденокарциномы желудка человека AGS (Park, 2011), вызывал аутофагию (процесс самопереваривания клеток, маркированный по аккумуляции белка Beclin-1 и превращению белка LC3-I, ассоциированного с микротрубочками, в LC3-II) и апоптоз, связанный с ингибированием экспрессии протоонкогенов Bcl-2 и Bcl-xL, потерей потенциала мембран митохондрий.

Как и при исследовании антипролиферативных свойств установлена связь проапоптотического эффекта фукоиданов со структурными характеристиками. В частности, в ряде работ показано усиление проапоптотических эффектов полисахарида после химического сульфатирования его молекулы (Haroun-Bouhedja, 2000; Koyanagi, 2003; Teruya, 2005; Cho, 2011).

При апоптозе под действием фукоидана промиелоидных лейкоэмических клеток HL60 (промиелоцитарные клетки лейкемии человека), NB4 (клетки лейкемии человека) и THP-1 клеток (моноцитарно-макрофагальная линия клеток человека) происходит активация MEKK1, MEK1, ERK1/2 и JNK, восстановление глутатиона и образование NO (Jin, 2010).

Исследован проапоптотический эффект фукоидана, выделенного из бурой водоросли *F. evanescens* (Запорожец, 2006). В экспериментах были использованы клетки перевиваемых клеточных линий — Jurkat (Т-клеточный лимфо-бластоидный лейкоз человека), H9 (Т-клеточная лейкемия человека), SEM (Т-клеточная лейкемия человека), HL-60 (миелобластный лейкоз), NB4 (промиелоциты) и K562 (эритробластный лейкоз). Фукоидан увеличивал количество апоптотических клеток линии H9 в конечной концентрации 100 мкг/мл (рис.13.1), а также индуцировал апоптоз в культуре клеток K562 и HL-60.

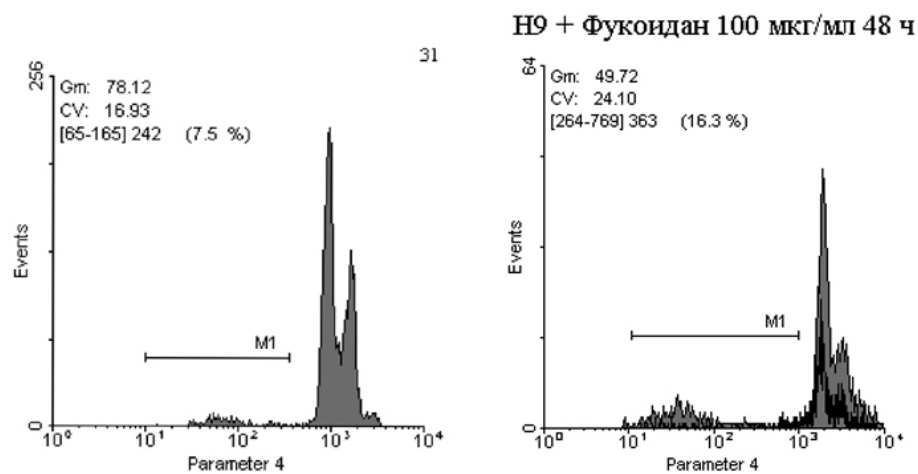


Рис. 13.1. Гистограммы, иллюстрирующие влияние фукоидана на апоптоз клеток персистирующей клеточной линии N9. По осям абсцисс — интенсивность флюоресценции клеток (в усл.ед.); по осям ординат — число событий с данным уровнем флюоресценции. Клетки окрашены йодидом пропидия в условиях, нарушающих целостность их мембраны. M1-гиподиплоидные клетки

Показана способность фукоиданов из *F. evanescens* и *L. cichorioides* модулировать апоптоз клеток лейкоза человека МТ-4 или Namalwa, индуцированный ингибитором топоизомеразы II - этопозидом (Фильченков, 2006, 2007). При индукции этопозидом апоптоза в клетках МТ-4, предкультивированных с фукоиданами, в течение суток и на протяжении нескольких пассажей (до 14 суток) обнаруживались признаки этопозид-индуцированного апоптоза (рис. 13.2). Обращает на себя внимание факт, что апоптоз-индуцирующее действие в меньшей степени было выражено в случае прединкубации клеток с фукоиданом из *F. evanescens* (1,3;1,4- α -L-фукан) (рис. 13.2 г), и наиболее выражено для препарата из *L. cichorioides* (высокосульфатированный 1,3- α -L-фукан) (рис. 13.2). При инкубации клеток МТ-4 с фукоиданами на протяжении 48 ч распределение клеток МТ-4 по фазам цикла практически не отличалось от такового в контроле. Эти результаты не согласуются с данными, полученными D. Riou (Riou, 1996) и K. Haneji (Haneji, 2005), которые наблюдали остановку в G1-фазе клеточного цикла при действии фукоидана *in vitro*. Такое расхождение может быть объяснено различиями в используемых препаратах фукоидана, либо особенностями клеточной модели.

Усиление индукции апоптоза под действием всех исследованных фукоиданов не сопровождалось дополнительной активацией каспазы-3, что свидетельствует как о предельном уровне активации этого

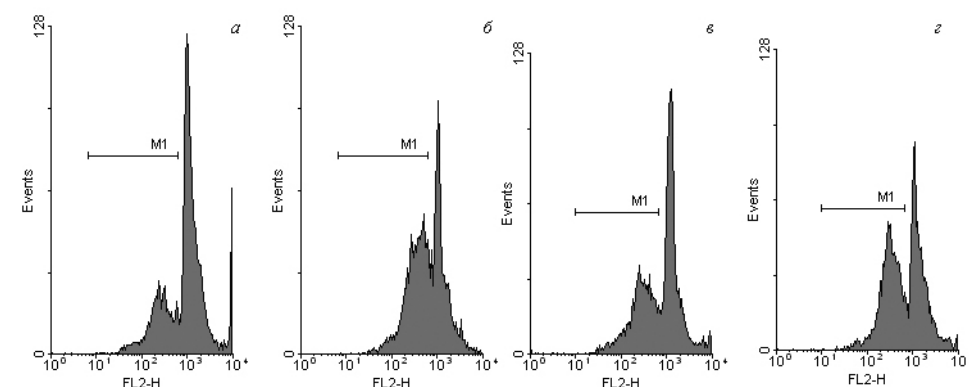


Рис. 13.2. Определение количества гиподиплоидных клеток по данным проточной цитометрии. Клетки МТ-4 обрабатывали препаратами фукоидана и затем культивировали в присутствии индуктора апоптоза этопозид (в дозе 4 мкг/мл): а — контроль; б — Ф1; в — Ф2; г — Ф3 фермента, необходимом для развития апоптоза в данной системе, так, возможно, и о подключении других каспазо-независимых путей реализации апоптоза (рис. 13.3).

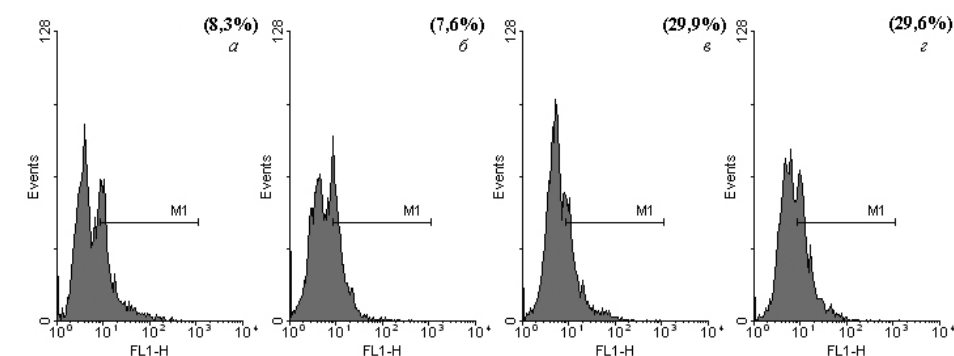


Рис. 13.3. Активные формы каспазы-3 в МТ-4 клетках : а — контроль (без обработки); б — фукоидан - 18 часов; в — этопозид 4мг/мл; г — фукоидан 18 часов+этопозид 4мг/мл

Исследованные фукоиданы отличались друг от друга типом гликозидных связей, моносахаридным составом, степенью сульфатирования, молекулярными массами. Тем не менее, все препараты фукоиданов обладали проапоптотической активностью. Возможно, что для проявления данной биологической активности тип связи не важен, либо необходимо присутствие только α -1,3-связанной фукозы, степень же сульфатирования может быть достаточной даже в случае использования самого низкосульфатированного препарата.

Одним из интегративных факторов, объединяющих все апоптотиче-

ские сигналы, является оксидативный стресс (Утешев, 1998; Vajt, 2002). Анализ имеющихся в литературе материалов достаточно определенно указывает на преапоптозные нарушения в митохондриях, связанные с избыточным образованием активных форм кислорода и продуктов его последующих превращений (Stoian, 1996). С этим сдвигом связывается факт образования пор во внутренней мембране митохондрий, рассматриваемый как необходимый этап, ведущий к появлению апоптоза (Zoratti, 1995). TNF α и Fas-индуцированный апоптоз, в известной степени, также обусловлен способностью вызывать в клетке образование реактивных форм кислорода (Takeda, 2002). Апоптотическая смерть клетки может быть индуцирована адгезивным сигналом. Так, P.A. Gibling с соавторами (Gibling, 1997) показали, что сшивание фукоиданом L-селектина - внутриклеточного домена, связанного с апоптоз-индуцирующей молекулой Fas (Ishiwatari-Nayasaka, 1997), индуцирует апоптоз в рецептор-экспрессирующих клетках. В главе 9 показано, что фукоидан индуцирует продукцию активных форм кислорода нейтрофилами, синтез TNF α и IL-1 мононуклеарами, а также обладает выраженной митогенной активностью и способностью усиливать экспрессию рецепторов адгезии. Учитывая полученные нами данные и литературные материалы, можно полагать, что оксидативный стресс, индукция цитокинов, митогенный и адгезивный сигналы могут быть решающими в обеспечении проапоптотических свойств СПС из морских водорослей. Подобная трактовка в отношении оксидативного стресса, модулирующего TNF и Fas — опосредованный апоптоз *in vivo*, приведена в работе (Takeda, 2002).

Антиметастатическое действие сульфатированных полисахаридов из морских водорослей

Инвазивная и метастатическая способность опухолевых клеток является следствием приобретения ими целого ряда фенотипических характеристик, включая: дисрегуляцию адгезивных взаимодействий опухолевых клеток друг с другом, с нормальными клетками микроокружения и с внеклеточным матриксом; продуцирование протеолитических энзимов, разрушающих внеклеточный матрикс; приобретение клеткой локомоторного фенотипа, включающего в себя изменения морфологии и цитоскелета; индуцирование ангиогенеза, обеспечивающего дополнительные пути эвакуации клеток первичной опухоли. Важное значение имеют такие свойства опухолевой клетки, как способность к деформации, пластичность и способность размножаться в условиях механического противодействия микроокружения.

Эти разнообразные фенотипические признаки определяются экс-

прессией различных молекул, кодируемых генами, которые, можно отнести к двум группам: активаторам и супрессорам инвазии и/или метастазирования. Лечение метастазирующих опухолей является одной из наиболее сложных задач онкологии, что определяет поиск веществ, способных эффективно воздействовать на различные компоненты процесса метастазирования.

Фукоиданы могут препятствовать распространению метастазов и опухолевых клеток путем связывания с факторами роста и молекулами клеточной адгезии. Так, показано, что сульфатированные олигосахариды препятствуют связыванию фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора роста фибробластов FGF с рецепторами для них, ингибируя VEGF и FGF-опосредованный ангиогенез (Jayson, 1997). В работе (Coombe, 1987) приведены данные о подавлении фукоиданом легочных метастазов после внутривенных инъекций клеток аденокарциномы 13762MAT молочной железы крыс. В условиях *in vivo* фукоидан при неоднократном введении ингибировал фиксацию метастатических клеток саркомы L-1 в легких мышей BALB/c (Roszkowski W., 1989). Фукоиданы, выделенные из *L. saccharina*, *L. digitata*, *F. serratus*, *F. distichus* и *F. vesiculosus*, подавляли адгезию клеток карциномы молочной железы MDA-MB-231 к тромбоцитам (Cumashi, 2007). Фукоидан из *L. japonica* со средней молекулярной массой 75 кДа в дозе 100 мг/кг снижал массу первичной опухоли карциномы легких Льюиса и на 34% уменьшал количество метастатических очагов (Разина, 2010). Т.В. Алексеенко с соавт. (Алексеенко, 2007), исследовавшие противоопухолевую и антиметастатическую активность фукоидана из *F. evanescens* на модели экспериментальной перевиваемой аденокарциномы легких Льюиса у мышей линии C57BL/6J, установили самостоятельное умеренное антиметастатическое действие полисахарида, а также потенцирование антиметастатической, но не противоопухолевой активности циклофосфана, наиболее выраженное при повторном введении в дозе 5 мг/кг.

Фибронектин является белком зрелой соединительной ткани с выраженными адгезивными свойствами, который синтезируется практически всеми видами клеток за исключением некоторых видов нервных клеток. Он присутствует в организме в виде двух форм: нерастворимая форма в виде фибриллярной сети существует на клеточной поверхности и во внеклеточном матриксе; растворимая - в крови. Обе формы вовлекаются в разнообразные процессы: способствуют адгезии и распространению эпителиальных и мезенхимальных клеток, стимулируют пролиферацию и миграцию эмбриональных и опухолевых клеток, активно участвуют в воспалительных и репаративных процессах. Фукоиданы из *Ascophyllum nodosum* (Liu, 2000, 2005) и *Spatoglossum schröderi* (Rocha, Moraes, 2005) с

высокой аффинностью связывались с фибронектином и ингибировали адгезию клеток к экстрацеллюлярному матриксу. Антиметастатический эффект фукоиданов был обусловлен ингибированием гепарин-связывающего и клеточно-связывающего доменов белка, реорганизацией альфа 5 субъединицы интегрина, а также подавлением экспрессии винкулина (Liu J.M., 2000, 2005; Rocha, Franco, 2005). Важно отметить, что десульфатированный фукоидан не обладал способностью связываться с фибронектином и, как следствие, утрачивал способность ингибировать адгезию клеток (Rocha H.A., Franco, 2005).

Вищук О. С. проведен анализ (Вищук, 2009) противоопухолевой и антиметастатической активности фукоиданов, выделенных из 9 видов бурых водорослей (*F. evanescens*, *L. japonica*, *U. pinnatifida*, *L. cichorioides* (Охотские море), *Sargassum swartzii*, *S. mcClurei*, *S. denticarpum* *Sargassum* sp., *S. polycystum* (Южно-Китайское море) и имеющих различную структуру. Фукоиданы, выделенные из бурых водорослей дальневосточных морей, являются высокосульфатированными полисахаридами, тогда как фукоиданы из бурых водорослей Южно-Китайского моря – низкосульфатированные (содержание сульфатных групп менее 12 %), за исключением фукоидана из *S. polycystum* (табл. 13.1)

Таблица 13.1

Структурные характеристики фукоиданов бурых водорослей

№	Водоросли	Mr, кДа	SO ₃ Na	Моносахаридный состав, мольные %				
				Fuc	Gal	Man	Xyl	Glc
1	<i>F. evanescens</i>	20-40	31	94.9	1.93	0.2	2.8	0
2	<i>L. japonica</i>	20-30	26	59.4	43.4	5.2	2.2	9.6
3	<i>L. cichorioides</i>	60-80	38	91.8	4.6	3.5	0	0
4	<i>U. pinnatifida</i>	30-50	36	33.8	61.1	2	0.9	2.2
5	<i>S. swartzii</i>	Н.о.	5.9	35.8	32.3	19.2	9.9	2.8
6	<i>S. oligocystum</i>	Н.о.	9.1	41.3	38.3	8.9	7.1	3.4
7	<i>S. denticarpum</i>	Н.о.	11.2	40.1	15.9	38.7	5.3	0
8	<i>S. mcClurei</i>	Н.о.	2.8	38.5	4.2	33.1	3.6	20.6
9	<i>S. polycystum</i>	Н.о.	32.1	32.4	12.6	35.3	8.5	11.2

Все исследованные фукоиданы были нетоксичны по отношению к клеткам рака кишечника человека DLD-1 и HT-29 в концентрации до 200 мкг/мл. При обработке клеток фукоиданы (50 мкг/мл) в различной степени тормозили рост колоний клеток DLD-1 и HT-29 (рис. 13.4).

Фукоиданы из *L. cichorioides* и *L. japonica* проявили наиболее выраженное противоопухолевое действие в ряду изученных фукоиданов. Фукоиданы из *S. swartzii*, *S. denticarpum*, и *S. mcClurei* практически не обладали противоопухолевой активностью. Вероятно, противоопухолевая активность изученных фукоиданов зависела от строения главной цепи молекулы. Об этом говорит тот факт, что главная цепь фукоидана из *L. cichorioides*, проявившего наибольшую активность, построена из α-1,3-связанной фукозы. Фукоиданы из *F. evanescens* и *U. pinnatifida*, активность которых была меньше, построены из 1,3-;1,4-связанных остатков α-L-фукопиранозы и чередующихся 1,3-;1,4-связанных остатков α-L-фукопиранозы и галактозы, соответственно.

Сопоставление полученных результатов по противоопухолевому действию девяти исследованных фукоиданов из водорослей, собранных в разных регионах, позволило выявить среди них как высокоактивные ингибиторы роста колоний клеток рака кишечника, так и фукоиданы, практически не проявляющие такого действия.

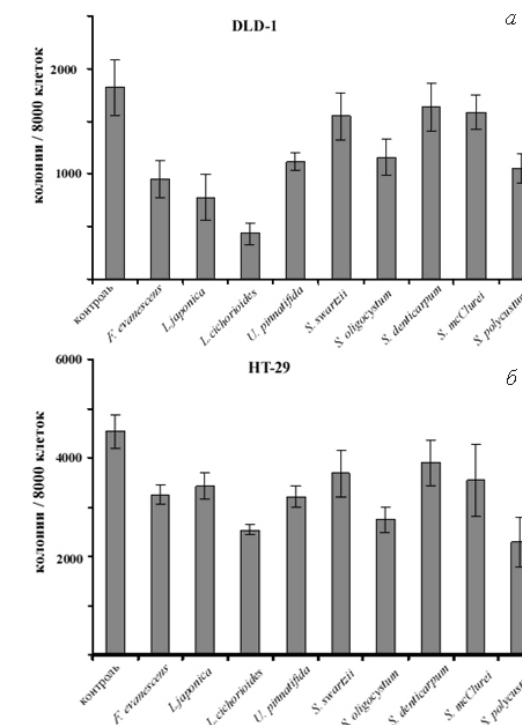


Рис. 13.4. Ингибирующее действие фукоиданов на рост колоний клеток рака кишечника человека DLD-1 (а) и HT-29 (б)

Клетки рака кишечника DLD-1 (а) и HT-29 (б) (8×10^3 клеток) обрабатывали фукоиданами из бурых водорослей (50 мкг/мл) в ВМЕ агаре, содержащем 10% FBS. Клетки культивировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 30 дней. Колонии клеток рака кишечника человека были оценены с использованием обратимого микроскопа и Motiс Image Plus программы.

Важным направлением в онкологии является предупреждение развития онкологических заболеваний. Показано, что фукоиданы из *L. guryanovae* (Lee, 2008) и *L. cichorioides* (Lee, 2008) подавляли неопластическую трансформацию нормальных мышечных эпидермальных клеток JB6 C141, вызываемую действием эпидермального фактора роста (EGF) или 12-О-тетрадеканойлфорбол-

13-ацетата (ТРА). Фукоидан способен взаимодействовать непосредственно с EGF и тем самым препятствовать связыванию EGF с его рецептором на поверхности эпидермальных клеток. Вследствие ингибирования фосфорилирования рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) происходит подавление фосфорилирования ERK и активности факторов транскрипции *c-fos* и *c-jun*. Таким образом, СПС являются перспективными соединениями для профилактики онкологических заболеваний.

Антиангиогенное действие сульфатированных полисахаридов

Под ангиогенезом понимают процесс образования новых кровеносных сосудов, который происходит в нормальных и патологически измененных тканях эукариотических организмов под влиянием ауто- и паракринных регуляторов (Фильченков, 2007). Ангиогенез поддерживает в организме оптимальную плотность кровеносных сосудов, обеспечивающих попадание в ткани и органы кислорода, питательных веществ, сигнальных молекул и циркулирующих клеток, а также выведение продуктов клеточного метаболизма. Опухолевый рост и метастазирование сопровождаются развитием неконтролируемого ангиогенеза, характеризующегося усиленной экспрессией основного фибробластного ростового фактора (bFGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), повышением активности матрикс-металлопротеиназ (Jung, 2001; Соляник, 2006).

Антиангиогенная терапия может быть как прямой, направленной на здоровые, генетически стабильные клетки сосудов опухоли (антагонисты VEGF-рецептора, антитела к VEGF-рецептору, нейтрализующие антитела и молекулы-антагонисты к рецепторам интегринов и молекул адгезии, специфически экспрессируемых на вновь образованных эндотелиальных клетках), так и непрямой — снижающей образование или нейтрализующей стимуляторы неангиогенеза, в первую очередь, фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) и матрикс-металлопротеиназы.

Угнетение ангиогенеза является одним из важных механизмов противоопухолевого действия фукоиданов. М. Narazaki (Narazaki, 2008) установили, что фукоидан снижает VEGF165-индуцированный ангиогенез и неоваскуляризацию опухоли у мышей. Механизм действия полисахаридов связан с уменьшением на поверхности эндотелиальных клеток экспрессии VEGFR-1 и VEGFR-2, нейрофилинов (NRP1 и NRP2), через которые VEGF осуществляет свои эффекты, а также с блокадой связывания семафоринов класса 3 и VEGFR-1. Авторы полагают, что фукоидан, связываясь с внеклеточным доменом NRP1 и сквенджер-рецептором (SREC-I), индуцирует интернализацию NRP1 и SREC-I в лизосомы.

J. Ye с соавторами (Ye, 2005) установили способность фукоидана из

Cladosiphon novae-caledoniae in vitro блокировать ангиогенез клеток карциномы HeLa, подавляя экспрессию и секрецию эндотелиального фактора роста сосудов VEGF. По мнению авторов, ингибирование инвазии опухолевых клеток и ангиогенеза обусловлено, по крайней мере, частично, антиоксидантным потенциалом фукоидана - активацией антиоксидативных ферментов — супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы.

В опухолевых клетках, а также в клетках эндотелия активно экспрессируются матриксные металлопротеиназы (Jung, 2001). Они вовлечены в деградацию клеточного матрикса и миграцию эндотелиальных клеток. К настоящему времени охарактеризовано 25 MMP, которые объединены в группы коллагеназ, желатиназ, матрилизина, стромелизинов, металлопротеиназ мембранного типа (Brauer, 2006). MMPs играют важную роль в физиологических и патологических процессах, включая эмбриогенез, тканевое ремоделирование, заживление ран, воспаление. Основная их функция в опухолевых клетках — разрушение базальной мембраны и облегчение клеточной инвазии. Известно, что инвазивный потенциал опухолевых клеток ингибируется блокаторами MMP (Li, 2001). Эти препараты активно используются в настоящее время в клинической практике. Однако они обладают нежелательным побочным действием. Активными ингибиторами MMP являются СПС из морских гидробионтов, в частности, из водорослей (Senni, 2006; Moon, 2009; Hlawagjty, 2011). В терапевтических дозах эти биополимеры безвредны, нетоксичны и могут рассматриваться как перспективные ингибиторы металлопротеиназ в терапии злокачественных новообразований. Экспрессию белка MMP-9, индуцированную TNF-альфа в лейкемических клетках человека U937, усиливал коммерческий фукоидан из *Fucus vesiculosus* (Sun J., 2010). О возможности ингибирования матрикс-металлопротеиназ фукоиданом сообщается в работах (Senni K., 2006; Moon H.J., 2009; Hlawaty H., 2011).

Установленная нами способность фукоиданов из *Fucus evanescens* (Do, 2010), *F. vesiculosus* (Moon, Lee, 2009) и *Costaria costata* (Moon, Park, 2009) ингибировать фосфорилирование ERK, JNK и p-38, экспрессию матричной РНК и белка MMP-1 в клетках кератиноцитов человека (HaCaT) и фибробластов кожи человека (HS68) позволяет определить новое направление использования полисахаридов в качестве агентов, защищающих кожу от ультрафиолетового облучения.

В работе (Koynagi, 2003) показано подавление природным и гиперсульфатированным фукоиданом неоваскуляризации, индуцированной клетками Sarcoma 180, саркомы легких Льюис и меланомы B16 у мышей, сопряженной с ингибированием митогенной и хемотаксической активности VEGF.

S. Soeda с соавторами (Soeda, 2000) показали также, что гиперсульфати-

рованнный фукоидан значительно подавляет индуцированную фактором роста фибробластов bFGF миграцию человеческих эндотелиоцитов, увеличивает продукцию ингибитора активатора плазминогена-1, что может играть ключевую роль для предотвращения миграции клеток сосудов.

Фукоидан из бурой водоросли *Turbinaria conoides* подавлял ангиогенез в клетках хориона аллантаической мембраны развивающихся куриных эмбрионов (Delma, 2008), в которые вводили клетки карциномы толстой кишки COLO 320DM. Этот же полисахарид подавлял миграцию опухолевых клеток.

Значительную роль в ангиогенезе играет циклооксигеназа COX-2, проангиогенный эффект которой обусловлен, по крайней мере, тремя продуктами метаболизма - тромбоксаном A(2), простагландинами E2 и I2 (Gately, 2004). Экспрессия COX-2 наблюдается как при предраковых состояниях, так и при злокачественном росте. В последнем случае наблюдается усиленная экспрессия этого фермента. Замечено, что снижение рецидивирования опухолей наблюдается при приеме ингибиторов ЦОГ-2 (например, нестероидных противовоспалительных препаратов). Поскольку известен ингибирующий эффект фукоиданов на экспрессию COX-2, то, по-видимому, снижение уровня этого фермента в клетках опухоли является одним из механизмов противоопухолевого действия фукоиданов. В связи с этим СПС в качестве ингибиторов COX-2 и простагландина E2 могут в будущем рассматриваться в качестве средства противораковой терапии (Park, 2011).

Роль иммунной системы в развитии опухолей

Среди отличительных характеристик злокачественных опухолей (наряду с самообеспечением клеток внутренними сигналами роста, игнорированием рост-ингибирующих сигналов, избеганием клеточной гибели, безудержной репликацией, поддержанием ангиогенеза (Hanahan, 2000), большое значение имеет способность клеток уклоняться от иммунного надзора (Dunn, 2002; 2004). Противоопухолевый иммунитет реализуется с участием Th1-зависимого и, в меньшей степени, Th2-зависимого иммунного ответа (Dunn, 2002, 2004; Hanahan, 2000; Zitvogel, 2006; Kim, 2007), а также факторов врожденного иммунитета, повреждающих опухолевые клетки (NK-клеток, моноцитов/ макрофагов, α и β интерферонов, ЛАК-клеток).

Существование многочисленных способов супрессии и ускользания от иммунной системы у злокачественных новообразований привело к появлению огромного числа методов иммунотерапии рака. Моноклональные антитела первого и второго поколений, иммуномодуляторы, различные цитокины, иммунные адъюванты, профилактические и терапевтические вакцины, супрессоры иммунных клеток, адаптивная Т-клеточная те-

рапия, трансплантация клеток костного мозга (Dougan M., 2009) — вот лишь краткий перечень направлений в иммунотерапии рака.

В последнее время внимание исследователей сосредоточено на неоднородности циркулирующих моноцитов и тканевых макрофагов. Выделяют не менее 2 фенотипически различающихся субпопуляции макрофагов CD14^{hi}CD16 (M1) и CD14^{low}CD16 (M2), обладающих воспалительными либо противовоспалительными свойствами (Gordon S., 2005; Mills C.D., 2000, Mosser D.M., 2003).

При бластомогенезе макрофаги приобретают фенотип M2: не проявляют противоопухолевой активности, не вырабатывают токсических медиаторов, усиливают ангиогенез, способствуют опухолевой прогрессии и метастазированию (Mantovani, 2006). Преобладание статуса M2 у макрофагов при злокачественных новообразованиях коррелирует с супрессией противоопухолевых Т- и NK клеток и является неблагоприятным прогностическим признаком (Budhu, 2006)

Показано, что противоопухолевый эффект фукоиданов во многом обусловлен их способностью активировать макрофаги (Patankar, 1993; Wang, 2010), в частности, поляризовать дифференцировку моноцитов в макрофаги M1 фенотипа (с выраженными противоопухолевыми свойствами) и поддерживать Th1 тип иммунного ответа, а также повышать продукцию IL-12 и снижать IL-10 (Schepetkin, 2006).

Е. Choi с соавторами (Choi, 2005) наблюдали усиление цитотоксичности макрофагов и лимфоцитов селезенки мышей по отношению к опухолевым клеткам, сопровождающееся увеличением продукции NO, H₂O₂, TNF α и IL-6, повышением фагоцитарной и лизосомальной активности клеток после культивирования с фукоиданом.

Данные по влиянию фукоидана из *U. pinnatifida* на функциональную активность клеток врожденного и адаптивного иммунитета представлены в серии работ Н. Maruyama с соавторами (Maruyama, 2003; 2005; 2006). Показано увеличение количества и усиление цитолитического действия NK клеток по отношению к клеткам-мишеням YAC (Maruyama, 2006), повышение уровня IFN γ , продуцируемого Т-лимфоцитами (Maruyama, 2003).

Фукоиданы из водорослей *Sargassum* sp. и *F. evanescens* также значительно повышали цитолитическую активность NK-клеток мышей линии C57Bl/6JCL, которым в течение 4-х дней до введения клеток меланомы B6 или карциномы легких вводили фукоидан в дозе 50 мг/кг (Ale, Maruyama, 2011).

Увеличение количества NK-клеток в селезенке мышей с опухолью кишечника, получавших перорально фукоидан из *S. okamuranus*, наблюдали К. Azuma с соавторами (Azuma, 2012).

В главе 11 мы показали, что СПС являются агонистами Toll-like рецепторов, главных компонентов системы врожденного иммунитета. Последние в настоящее время интенсивно изучаются в качестве адъювантов вакцин и антигеннезависимых стимуляторов иммунитета в терапии рака (Tse, 2007). Ряд агонистов TLR находятся на стадиях предклинического и клинического изучения с целью поиска эффективных путей борьбы со злокачественными новообразованиями (Kanzler, 2007; Krieg, 2007). Однако, как оказалось, вопрос не так однозначен, как представлялось сначала. С одной стороны показано, что TLR и их лиганды могут выступать в роли супрессоров опухолевого роста, с другой стороны, они могут стимулировать опухолевую прогрессию и влиять на устойчивость опухолей к химиотерапии. В связи с этим предстоит серьезное изучение их роли при злокачественном росте с целью предотвращения их негативных эффектов на развитие различных опухолей.

Таким образом, антипролиферативные, проапоптотические, антиметастатические, антиангиогенные и иммуномодулирующие свойства сульфатированных полисахаридов водорослей определяют перспективность их использования при разработке и создании противоопухолевых средств.

Литература

Abdel-Fattah A.F., Hussein M.M., Salem H.M. Studies of the purification and some properties of sargassan, a sulphated heteropolysaccharides from *Sargassum linifolium* // Carbohydr. Res. 1974. Vol. 33, N 1. P. 9–17.

Adams J., Palombella V.J., Sausville E.A. et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents // Cancer Res. 1999. Vol. 159, N 11. P. 2615–2622.

Adhami V.M., Malik A., Zaman N. et al. Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer both *in vitro* and *in vivo* // Clin. Cancer Res. 2007. Vol. 13, N 5. P. 1611–1619.

Adhikari U., Mateu C.G., Chattopadhyay K. et al. Structure and antiviral activity of sulfated fucans from *Stoechospermum marginatum* // Phytochemistry. 2006. Vol. 67. P. 2477–2482.

Aguiayo A., Kantarjian H., Manshoury T. et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes // Blood. 2000. Vol. 96, N. 6. P. 2240–2245.

Aisa Y., Miyakawa Y., Nakazato T. et al. Fucoidan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways // Am. J. Hematol. 2005. Vol. 78, N 1. P. 7–14.

Akhtar M., Tarig A.F., Awais M.M. et al. Studies on wheat bran arabi-xoxylan for its immunostimulatory and protective effects against avian coccidiosis // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 90, N 1. P. 333–339.

Akira S., Takeda K., Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity // Nat. Immunol. 2001. Vol. 2, N 8. P. 675–680.

Ale M.T., Maruyama H., Tamauchi H. et al. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo* // Int. J. Biol. Macromol. 2011. Vol. 49, N 3. P. 331–336.

Ale M.T., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds // Mar. Drugs. 2011. Vol. 9, N 10. P. 2106–2130.

Aleksandrov M.L., Gall L.N., Krasnov N.V. et al. Mechanism of ion formation during the electrohydrodynamic sputtering of a liquid into a vacuum // J. Anal. Chem. USSR. 1984. Vol. 39, N 9. P. 1268–1274.

Alexander C.G., Cutler R.L., Yellowless D. Studies on the comparison and enzyme content of the crystalline style of *Telescopium telescopium* (L.)

(Gastropoda) // Comp. Biochem. Physiol. 1979. Vol. 64, N 1. P. 83–89.

Al-Haj N.A., Mashan N.I., Shamsudin M.N. et al. Antibacterial activity in marine algae *Eucheuma denticulatum* against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* // Res. J. Biol. Sci. 2009. Vol. 4, N 4. P. 519–524.

Almeida-Lima J., Dantas-Santos N., Gomes D.L. et al. Evaluation of acute and subchronic toxicity of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan from the *Spatoglossum schroederi* in Wistar rat // Rev. Bras. Farmacogn. 2011. Vol. 21, N 4. P. 674–679.

Alvarez G.F., Bihari D., Collins D. Heparin-induced thrombosis with a normal platelet count // Crit. Care Resusc. 2007. Vol. 9, N 1. P. 51–53.

Alves A.P., Mulloy B., Diniz J.A. et al. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272, N 11. P. 6965–6971.

Amornrut C., Toida T., Imanari T. et al. New sulfated β -galactan from clams with anti HIV activity // Carbohydr. Res. 1999. Vol. 321, N 1-2. P. 121–127.

Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Ermakova S.P. et al. Anticancer activity *in vitro* of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem mass-spectrometry // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 87, N 1. P. 186–194.

Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L. et al. Structural analysis of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* by MALDI-TOF and tandem ESI mass spectrometry // Carbohydr. Res. 2009. Vol. 344, N 6. P. 779–787.

Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L. et al. Structural analysis of a highly sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* by tandem MALDI and ESI mass spectrometry // Carbohydr. Res. 2010. Vol. 345, N 15. P. 2206–2212.

Amano H., Kakinuma M., Coury D.A. et al. Effect of a seaweed mixture on serum lipid level and platelet aggregation in rat // Fish. Sci. 2005. Vol. 71. P. 1160–1166.

Andersen O.M., Markham K.R. Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. Boca Raton: CRS Press, 2010. 1256 p.

Andersen R.E., Wadden T.A., Bartlett S.J. et al. Relation of weight loss to changes in serum lipids and lipoproteins in obese women // Am. J. Clin. Nutr. 1995. Vol. 62, N 2. P. 350–357.

Anno K., Terahata H., Hayashi Y., Seno N. Isolation and purification of fucoidan from brown seaweed *Pelvetia wrightii* // Agric. Biol. Chem. 1966. Vol. 30, N 5. P. 495–499.

Aoki H., Kang P., Hampe J. et al. Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, N 12. P. 10244–10250.

Aoun Z.B., Said R.B., Farhat F. Anti-inflammatory, antioxidant and

antimicrobial activities of aqueous and organic extracts from *Dictyopteris membranacea* // Bot. Marina. 2010. Vol. 53, N 3. P. 259–264.

Apoya M., Ogawa N., Nanba N. Alginate content of farmed *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar from the three bays of Iwate, Japan during harvest period // Bot. Marina. 2002. Vol. 45, N 5. P. 445–452.

Araya N., Takanashi K., Sato T. et al. Fucoidan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus type-1-associated neurological disease // Antivir. Ther. 2011. Vol. 16, N 1. P. 89–98.

Ara J., Sultana V., Qasim R. et al. Hypolipidemic activity of seaweed from Karachi coast // Phytother. Res. 2002. Vol. 16, N 5. P. 479–483.

Arad S.M., Rappoport L., Moshkovich A. et al. Superior biolubricant from a species of red microalga // Langmuir. 2006. Vol. 22, N 17. P. 7313–7317.

Araya V., Gupta V.K. A review on marine immunomodulators // Int. J. Pharm. Life Sci. 2011. Vol. 2, N 5. P. 751–758.

Arikawa J., Yao J.S., Yoshimatsu K. et al. Protective role of antigenic sites on envelope protein of Hantaan virus defined by monoclonal antibodies // Arch. Virol. 1992. Vol. 126, N 1-4. P. 271–281.

Armant M.A., Fenton M. J. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals [Электронный ресурс] // Genome Biol. 2002. Vol. 3, N 8. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC139401/pdf/gb-2002-3-8-reviews3011.pdf>.

Aronson M., Medalia O., Schori L. et al. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl α -D-mannopyranoside // J. Infect. Dis. 1979. Vol. 139, N 3. P. 329–332.

Assreuy A.M.S., Gomes D.M., Silva M.S.J. et al. Biological effects of a sulfated polysaccharide isolated from the marine red algae *Champia feldmannii* // Biol. Pharm. Bull. 2008. Vol. 31, N 4. P. 691–695.

Athucorala Y., Ahn G.N., Jee Y.H. et al. Antiproliferative activity of sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of *Ecklonia cava* on the U-937 cell line // J. Appl. Phycol. 2009. Vol. 21. P. 307–314.

Athukorala Y., Jung W.K., Vasanthan T. et al. An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava* // Carbohydr. Polym. 2006. Vol. 66, N 2. P. 184–191.

Ausseil J., Desmaris N., Bigou S. et al. Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice // PloS One. 2008. Vol. 3, N 5. P. 1–11.

Ayala A., Song G.Y., Chung C.S. et al. Immune depression in polymicrobial sepsis: the role of necrotic (injured) tissue and endotoxin // Crit. Care Med. 2000. Vol. 28, N 8. P. 2949–2955.

Aziz M.A., Cabral J.D., Broks H.J.L. et al. Antimicrobial properties of a chitosan dextran-based hydrogel for surgical use // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. Vol. 56, N 1. P. 280–287.

Azuma K., Ishihara T., Nakamoto H. et al. Effects of oral administration of fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* on tumor growth and survival time in a tumor-bearing mouse model // *Mar. Drugs.* Vol. 10, N 10. P. 2337–2348.

Bachelet L., Bertholon I., Lavigne D. et al. Affinity of low molecular fucoidan for P selectin triggers its binding to activated human platelets // *Biochem. Biophys. Acta.* 2009. Vol. 1790, N 2. P. 141–146.

Back H.I., Kim S.Y., Park S.H. et al. Effects of fucoidan supplementation on *Helicobacter pylori* in humans // *FASEB J.* 2010. Vol. 24, Meet. abstr. Suppl. lb. 347.

Baglin T. Disseminated intravascular coagulation: diagnosis and treatment // *Brit. Med. J.* 1996. Vol. 312, N 7032. P. 683–687.

Bajt M.L. Ho Y.S., Vonderfecht S.L. et al. Reactive oxygen as modulator of TNF and fas receptor-mediated apoptosis *in vivo*: studies with glutathione peroxidase-deficient mice // *Antioxid Redox Sign.* 2002. Vol. 4, N 5. P. 733–740.

Balzarini J., Van Damme L. Microbicide drug candidates to prevent HIV infection // *Lancet.* 2007. Vol. 369, N 9563. P. 787–797.

Bandyopadhyay S.S., Navid M.H., Ghosh T. et al. Structural features and *in vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from *Sphacellaria indica* // *Phytochemistry.* 2011. Vol. 72, N 2-3. P. 276–283.

Bartholomaeus A.R., Boltob R., Ahokas J.T. Inhibition of rat liver cytosolic glutathione S-transferase by silybin // *Xenobiotica.* 1994. Vol. 24, N 1. P. 17–24.

Beere H.M. ‘The stress of dying’: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis // *J. Cell Sci.* 2004. Vol. 117, N 13. P. 2641–2651.

Ben-Zaken O., Tzaban S., Tal. Y. et al. Cellular heparan sulfate participates in the metabolism of prions // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, N 41. P. 4041–4049.

Beress A., Wassermann O., Bruhn T. et al. A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus* // *J. Nat. Prod.* 1993. Vol. 56, N 4. P. 478–488.

Berman R. *Ecklonia cava* extract: superior polyphenol and super-antioxidant for our time // *Townsend Lett.* 2008. N 294. P. 97–100.

Bernardi G., Springer G.F. Properties of highly purified fucan // *J. Biol. Chem.* 1962. Vol. 237, N 1. P. 75–80.

Berteau O., Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide // *Glycobiology.* 2003. Vol. 13, N 6. P. 29R–40R.

Beyer R.E. The participation of coenzyme Q in free radical production and

antioxidation // *Free Radic. Mol. Med.* 1990. Vol. 8, N 6. P. 545–565.

Bhatia S., Sharma A., Sharma K. et al. Novel algal polysaccharides from marine source: Porphyran // *Pharmacogn. Rev.* 2008. Vol. 2, N 4. P. 271–276.

Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S. et al. Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima* // *Carbohydr. Res.* 2010. Vol. 345, N 14. P. 2038–2047.

Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S. et al. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. // *Carbohydr. Res.* 2006. Vol. 341, N 2. P. 238–245.

Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E. et al. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. // *Carbohydr. Res.* 2002. Vol. 337, N 8. P. 719–730.

Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E. et al. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. // *Carbohydr. Res.* 2004. Vol. 339, N 3. P. 511–517.

Binet R., Letoffe S., Ghigo J.M. et al. Protein secretion by gram-negative bacterial ABC exporters – a review // *Gene.* 1997. Vol. 192, N 1. P. 7–11.

Black W.A.P., Dewar E.D., Woodward F.N. Manufacture of algal chemicals. IV. Laboratory-scale isolation of fucoidin from brown marine algae // *J. Sci. Food Agric.* 1952. Vol. 3, N 3. P. 122–129.

Blander J.M., Meddhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-receptors // *Science.* 2004. Vol. 304, N 5673. P. 1014–1018.

Blondin C., Fischer E., Boisson-Vidal C. et al. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown seaweed // *Mol. Immunol.* 1994. Vol. 31, N 4. P. 247–253.

Boisson-Vidal C., Chaubet F., Chevotot L. et al. Relationship between antithrombotic activities of fucans and their structure // *Drug Dev. Res.* 2000. Vol. 51, N 4. P. 216–224.

Boneu B. Low molecular weight heparins: are they superior to unfractionated heparins to prevent and to treat deep vein thrombosis? // *Thromb. Res.* 2000. Vol. 100, N 2. P. 113–120.

Boo H.J., Hyun J.H., Kim S.C. et al. Fucoidan from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in A549 human lung carcinoma cells // *Phytother. Res.* 2011. Vol. 25, N 7. P. 1082–1086.

Boonghum W., Peerapornpisal Y., Kanjanapoth D., et al. Antioxidant activity of some seaweed from the gulf of Thailand // *Int. J. Agric. Biol.* 2011. Vol. 13, N 1. P. 95–99.

Boopathy N.S., Kathiresan K. Anticancer drugs from marine flora: an overview [Электронный ресурс] // *J. Oncol.* 2010. Vol. 2010. Режим доступа: <http://www.hindawi.com/journals/jo/2010/214186/>

Bounameaux H., de Moerloose P. Is laboratory monitoring of low-molecular-weight heparin therapy necessary? No // *J. Thromb. Haemost.* 2004. Vol. 2, N 4. P. 551–554.

Bourgougnon N., Lahaye M., Quemener B. et al. Annual variation in composition and *in vitro* anti-HIV-1 activity of the sulfated glucuronogalactan from *Schizymania dubui* // *J. App. Phycol.* 1996, N 8. P. 155–161.

Bowdish D.M., Davidson D.J., Hancock R.E. A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2005. Vol. 6, N 1. P. 35–51.

Brandenburg K., Weise A. Endotoxins: relationships between structure, functions and activity // *Curr. Top. Med. Chem.* 2004. Vol. 4, N 11. P. 1127–1146.

Brauer P.R. MMPs – role in cardiovascular development and disease // *Front Biosci.* 2006. Vol. 11, N 1. P. 447–448.

Brennan M.J., Hannah J.H., Leininger E. Adhesion of *Bordetella pertussis* to sulfatides and to the GalNac β 4Gal sequence found in glycosphingolipid // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266, N 28. P. 18827–18831.

Brunner G., Reibold K., Meissauer A. et al. Sulfated glycosaminoglycans enhance tumor cell invasion *in vitro* by stimulating plasminogen activation // *Exp. Cell Res.* 1998. Vol. 239, N 2. P. 301–310.

Budhu A., Forgues M., Ye Q.H. et al. Prediction of venous metastases, recurrence and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the livermicroenvironment // *Cancer Cell.* 2006. Vol. 10, N 2. P. 99–111.

Bui L.M., Ngo B.Q., Nguyen N.D. et al. Studies on fucoidan and its production from Vietnamese brown seaweeds // *Asean J. Sci Technol. Dev.* 2005. Vol. 22, N 4. P. 371–380.

Busch K.L., Glish G.L., Mcluckey S.A. Mass spectrometry : Techniques and applications of tandem mass spectrometry. Weinheim; Basel; Cambridge; New York: VCH Verlagsgesellschaft, 1988. 333 p. ISBN 0-89573-275-0.

Caceres P.J., Carlucci M.J., Damonte E.B. et al. Carrageenans from Chilean samples of *stenogramme interrupta*: structural analysis and biological activity // *Phytochemistry.* 2000. Vol. 53. N 1. P. 81–86.

Cancilla M.T., Penn S.G., Carroll J.A. et al. Coordination of alkali metals to oligosaccharides dictates fragmentation behavior in matrix assisted laser desorption ionization Fourier transform mass spectrometry // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. Vol. 118, N 28. P. 6736–6745.

Cardoso M.L., Xavier C.A., Bezerra M.B. et al. Assessment of zymosan-induced leukocyte influx in a rat model using sulfated polysaccharides // *Planta Med.* 2010. Vol. 76, N 2. P. 113–119.

Carlucci M.J., Pujol C.A., Ciancia M. et al. Antiherpetic and anticoagulant

properties of carrageenans from the red seaweeds and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological properties // *Int. J. Biol. Macromol.* 1997. Vol. 20, N 2. P. 97–105.

Carroll J.A., Willard D., Lebrilla C.B. Energetics of cross-ring cleavages and their relevance to the linkage determination of oligosaccharides // *Anal. Chim. Acta.* 1995. Vol. 307, N 2-3. P. 431–447.

Castelli R., Cassinerio E., Cappellini M.D. Heparin induced thrombocytopenia: pathogenetic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects // *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug. Targets.* 2007. Vol. 7, N 3. P. 153–162.

Chaoyuan W. The seaweed resources of China // *Seaweed resources of the world / ed. Alan T. Critchley, Masao Ohno. Yokosuka: JICA, 1998. P. 34–45.*

Chattopadhyay K., Mateu C.G., Mandal P. et al. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: isolation, structural features and antiviral activity // *Phytochemistry.* 2007. Vol. 68, N 10. P. 1428–1435.

Chawla A., Repa J.J., Evans R.M. et al. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files // *Science.* 2001. Vol. 294. N. 5548. P. 1866–1870.

Chen D., Wu X.Z., Wen Z.Y. Sulfated polysaccharides and immune response: promoter or inhibitor? // *Panminerva Med.* 2008. Vol. 50, N 2. P. 177–183.

Chen J.H., Lim J.D., Sohn E.H. et al. Growth-inhibitory effect of a fucoidan from brown seaweed *Undaria pinnatifida* on plasmodium parasites // *Parasitol. Res.* 2009. Vol. 104, N 2. P. 245–250.

Chen M.Z., Xie H.G., Yang L.W. et al. In vitro anti-influenza virus activities of sulfated polysaccharide fractions from *Gracilaria lemaneiformis* // *Virolog. Sin.* 2010. Vol. 25, N 5. P. 341–351.

Chen P., Baker A.G., Novotny M.V. The use of osazones as matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates // *Anal. Biochem.* 1997. Vol. 244, N. 1. P. 144–151.

Chen X., Carroll J.A., Beavis R.C. Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998. Vol. 9, N 9. P. 885–891.

Chen X., Ko L.J., Jayaraman L. et al. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells // *Gene Dev.* 1996. Vol. 10, N 19. P. 2438–2451.

Chen H., Zhang M., Xie B. Quantification of uronic acids in tea polysaccharides conjugates and their antioxidant properties // *J. Agric. Food. Chem.* 2004. Vol. 52, N 11. P. 3333–3336.

Cheng H.C. Chang W.L., Chen W.Y. et al. Levofloxacin-containing triple therapy to eradicate the persistent *H.pylori* after a failed conventional triple therapy // *Helicobacter.* 2007. Vol. 12. N 4. P. 359–363.

Cheong H.I., Lee B.S., Kang H.G. et al. Attempted treatment of factor H

deficiency by liver transplantation // *Pediatr. Nephrol.* 2004. Vol. 19, N 4. P. 454–458.

Chevolot L., Foucault A., Chaubet F. et al. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity // *Carbohydr. Res.* 1999. Vol. 319, N 1-4. P. 154–165.

Chevolot L., Mulloy B., Ratiskol J. et al. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae // *Carbohydr. Res.* 2001. Vol. 330, N 4. P. 529–535.

Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R. et al. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum* // *Carbohydr. Res.* 1999. Vol. 320, N 1-2. P. 108–119.

Cho G.Y., Klochkova N.G., Krupnova T.N. et al. The reclassification of *Lessonia laminarioides* (*Laminariales*, *Phaeophyceae*): *Pseudolessonia* gen. nov. // *J. Phycol.* 2006. Vol. 42, N 6. P. 1289–1299.

Cho M.L., Lee B.Y., You S.G. Relationship between oversulfation and conformation of low and high molecular weight fucoidans and evaluation of their *in vitro* anticancer activity // *Molecules.* 2011. Vol. 16, N 1. P. 291–297.

Choi E.M., Kim A.J., Kim Y.O. et al. Immunomodulating activity of arabinogalactan and fucoidan *in vitro* // *J. Med. Food.* 2005. Vol. 8, N 4. P. 446–453.

Choi J.I., Raghavendran H.R., Sung N.Y. et al. Effect of fucoidan on aspirin-induced stomach ulceration in rats // *Chem. Biol. Interact.* 2010. Vol. 183, N 1. P. 249–254.

Chong C.W., Hill S.L., Wong C.L. Antibacterial activity of *Sargassum polycystum* C. Agardh and *Padina australis* Hauck (Phaeophyceae) // *Afr. J. Biotechnol.* 2011. Vol. 10, N 64. P. 14125–14131.

Choosawad D., Leggat U., Dechsukhum C. et al. Anti-tumor activities of fucoidan from the aquatic plant *Utricularia aurea* Lour Songklanakarin // *J. Sci. Technol.* 2005. Vol. 27, N 3. P. 799–807.

Chung H.J., Jeun J., Hwang S.J. et al. Toxicological evaluation of fucoidan from *Undaria pinnatifida* *in vitro* and *in vivo* // *Phytother. Res.* 2010. Vol. 24, N 7. P. 1078–1083.

Church C.F., Meade J.B., Treanor R.E. et al. Antithrombin activity of fucoidan. The interaction of fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III, and thrombin // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264, N 6. P. 3618–3623.

Ciancia M., Matulewicz M.C., Stortz C.A. et al. Room-temperature, low-field ¹³C-nmr spectra of degraded carrageenans. Part 2. On the specificity of the autohydrolysis reaction in kappa/iota and mu/nu structures // *Int. J. Biol. Macromol.* 1991. Vol. 13, N 6. P. 337–340.

Ciancia M., Sato Y., Nonami H. et al. Autohydrolysis of a partially cyclized mu/nu-carrageenan and structural elucidation of the oligosaccharides by

chemical analysis, NMR spectroscopy and UV-MALDI mass spectrometry // *Arkivoc.* 2005. Pt. 12. P. 319–331.

Ciucano I., Kerek F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates // *Carbohydr. Res.* 1984. Vol. 131, N 2. P. 209–217.

Clark D.L., Su S., Davidson E.A. Saccharide anions as inhibitors of the malaria parasite // *Glycoconjugate J.* 1997. Vol. 14, N 4. P.473–479.

Clement M.J., Tissot B., Chevolot L. et al. NMR characterization and molecular modeling of fucoidan showing the importance of oligosaccharide branching in its anticomplementary activity // *Glycobiology.* 2010. Vol. 20, N 7. P. 883–894.

Colin S., Deniaud E., Jam M. et al. Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans // *Glycobiology.* 2006. Vol. 16, N.11. P. 1021–1032.

Collen P.N., Lemoine M.M., Daniellou R. et al. Enzymatic degradation of k-carrageenan in aqueous solution // *Biomacromolecules.* 2009. Vol. 10, N 7. P. 1757–1767.

Conchie J., Percival E.G.V. Fucoidin part II. The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from *Fucus vesiculosus* // *J. Chem. Soc.* 1950. P. 827–833.

Cooks R.G., Beynon J.H., Caprioli R.M. et al. *Metastable Ions.* Amsterdam: Elsevier Sci. Publ, 1973. 307 p.

Coombe D.R., Parish C.R., Ramshaw I.A. et al. Analysis of the inhibition of tumour metastasis by sulfated polysaccharides // *Int. J. Cancer.* 1987. Vol. 39, N 1. P. 82–88.

Cooper R., Dragar C., Elliot K. et al. GSF, a preparation of Tasmanian *Undaria pinnatifida* is associated with healing and inhibition of reactivation of Herpes // *BMC Complement Altern. Med.* 2002. Vol. 2, N 1. P. 11–18.

Copeland R., Balasubramaniam A., Tiwari V. et al. Using a 3-O-sulfated heparin octasaccharide to inhibit the entry of herpes simplex virus type 1 // *Biochemistry.* 2008. Vol. 47, N 21. P.5774–5783.

Cornish M.L., Garbary D.J. Antioxidant from macroalgae: potential applications in human health and nutrition // *Algae.* 2010. Vol. 25, N 4. P. 155–171.

Costa L.S., Fidelis G.P., Cordeiro S.L. et al. Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds // *Biomed. Pharmacother.* 2010. Vol. 64, N 1. P. 21–28.

Costa L.S., Telles C.B.S., Oliveira R.M. et al. Heterofucan from *Sargassum filipendula* induces apoptosis in HeLa cells // *Mar. Drugs.* 2011. Vol. 9, N 4. P. 603–614.

Costa L.S., Pereira G.F., Telles C.B. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of heterofucans from the seaweed *Sargassum filipendula* // *Mar.*

Drugs. 2011. Vol. 9, N 6. P.952–966.

Croci D.O., Cumashi A., Ushakova N.A. et al. Fucans, but not fucomannoglucuronans, determine the biological activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria saccharina* brown seaweeds // PloS One. 2011. Vol. 6, N 2. e17283.

Cui Y.Q., Zhang L.J., Zhang T. et al. Inhibitory effect of fucoidan on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated primary microglia // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2010. Vol. 37, N 4. P. 422–428.

Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds // Glycobiology. 2007. Vol. 17, N 5. P. 541–552.

Da Silva E.L., Abdalla D.S., Terao J. Inhibitory effect of flavonoids on low-density lipoprotein peroxidation catalyzed by mammalian 15-lipoxygenase // IUBMB Life. 2000. Vol. 49, N 4. P. 289–295.

Da Silva E.L., Tsushida T., Terao J. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucoside // Arch. Biochem. Biophys. 1998. Vol. 349, N 2. P. 313–320.

Damonte E.B., Matulevicz M.C., Cerezo A.S. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents // Cur. Med. Chem. 2004. Vol. 11, N 18. P. 2399–2419.

Daniel R., Chevolut L., Carrascal M. et al. Electrospray ionization mass spectrometry of oligosaccharides derived from fucoidan of *Ascophyllum nodosum* // Carbohydr. Res. 2007. Vol. 342, N 6. P. 826–834.

Daniel R., Berteau O., Jozefonvicz J., et al. Degradation of algal (*Ascophyllum nodosum*) fucoidan by an enzymatic activity contained in digestive glands of the marine mollusc *Pecten maximus* // Carbohydr. Res. 1999. Vol. 322, N 3. P. 291–297.

Das V., Bickers D.R., Mukhar H. Plant phenols as *in vitro* inhibitors of glutathione S-transferase(s) // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984. Vol. 120, N 2. P. 427–433.

D'Ayala G.G., Malinconico M., Laurienzo P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches // Molecules. 2008. Vol. 13, N 9. P. 2069–2106.

De Serres J., Groner A., Lindner J. Safety and efficacy of pasteurized C1 inhibitor concentrate (Berinert P) in hereditary angioedema // Transfus. Apher. Sci. 2003. Vol. 29, N 3. P. 247–254.

Deitch E.A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned // Shock. 1998. Vol. 9, N 1. P. 1–11.

Delma C., Ramalingam K., Pandian V. et al. Antagonistic effects of sulphated polysaccharides from *Turbinaria conoides* on tumor cell migration and

angiogenesis // Cancer Prev. Res. 2008. Vol. 1, N 7, suppl. A4.

Derhaschnig U., Pernerstorfer T., Knechtelsdorfer M. et al. Evaluation of antiinflammatory and antiadhesive effects of heparins in human endotoxemia // Crit. Care. Med. 2003. Vol. 31, N 4. P. 1108–1112.

Desaire H., Leary J.A. Utilization of MS3 spectra for the multicomponent quantification of diastereomeric N-acetylhexosamines // J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2000. Vol. 11, N 12. P. 1086–1094.

Desay U.R. New antithrombin-based anticoagulants // Med. Res. Rev. 2004. Vol. 24, N 2. P. 151–181.

De Serres J., Groner A., Lindner J. Safety and efficacy of pasteurized C1 inhibitor concentrate (Berinert P) in hereditary angioedema // Transfus. Apher. Sci. 2003. Vol. 29, N 3. P. 247–254.

Desvaux M., Parham N.J., Henderson I.R. Type V protein secretion: simplicity gone awry? // Curr. Iss. Mol. Biol. 2004. Vol. 6, N 2. P. 111–124.

Dianzani M.U. Biochemical aspects of fatty liver // Biochem. Soc. Trans. 1973. Vol. 1, pt. 4. P. 903–908.

Dillon T., Kristensen K., O'hEochdha C. et al. Seed mucilage of *Ascophyllum nodosum* // Proc. Royal Irish. Acad. 1953. Vol. 55, pt. 1. Sect. B. P. 189–194.

Do H., Pyo S., Sohn E.H. Suppression of iNOS expression by fucoidan is mediated by regulation of p38 MAPK, JAK/STAT, AP-1 and IRF-1 and depends on up-regulation of scavenger receptor B1 expression in TNF α and IFN γ -stimulated C6 glioma cells // J. Nutr. Biochem. 2010. Vol. 21, N 8. P. 671–679.

Dobashi K., Nishino T., Fujihara M. et al. Isolation and preliminary characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides with blood-anticoagulant activity from the brown seaweed *Hizikia fusiforme* // Carbohydr. Res. 1989. Vol.194, N 1. P. 315–320.

Doctor V.M., Hill C., Jackson G.J. Effect of fucoidan during activation of human plasminogen // Thromb. Res. 1995. Vol. 79, N 3. P. 243–247.

Doh-Ura K., Kuge T., Uomoto M. et al. Prophylactic effect of dietary seaweed fucoidan against enteral prion infection // Antimicrob. Agents. Chemother. 2007. Vol. 51, N 6. P. 2274–2277.

Domon B., Costello C.E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS MS spectra of glycoconjugates // Glycoconjugate J. 1988. Vol. 5. P. 397–409.

Dougan M., Dranoff G. Immune therapy for cancer // Annu. Rev. Immunol. 2009. Vol. 27. P. 83–117.

Drenth J.P., van der Meer J. W. The inflammasome- a linebacker of innate defense // N. Engl. J. Med. 2006. Vol. 355, N 7. P.730–732.

Duarte M.E., Cardoso M.A., Nosedá M.D. et al. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* // Carbohydr.

Polym. 2001. Vol. 333, N 4. P. 281–293.

Duffin K.L., Welply J.K., Huang E. et al. Characterization of N-linked oligosaccharides by electrospray and tandem mass-spectrometry // *Anal. Chem.* 1992. Vol. 64, N 13. P. 1440–1448.

Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape // *Nat. Immunol.* 2002. Vol. 3, N 11. P. 991–998.

Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting // *Immunity.* 2004. Vol. 21, N 2. P. 137–148.

Dutta A., Dutta S.K. Vitamin E and its role in the prevention of atherosclerosis and carcinogenesis: A review // *J. Am. Coll. Nutr.* 2003. Vol. 22, N 4. P. 258–268.

Dvir I., Stark A.H., Chayoth R. et al. Hypocholesterolemic effects of nutraceuticals produced from the red microalga *Porphyridium* sp. in rats // *Nutrients.* 2009. Vol. 1, N 2. P. 156–167.

Dvorak H.F., Brown L.F., Detmar M. et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor microvascular hyperpermeability and angiogenesis // *Am. J. Pathol.* 1995. Vol. 146, N 5. P. 1029–1039.

Eckman L. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections // *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2005. Vol. 21, N 2. P. 147–151.

Elliott P.J., Zollner T.M., Boehncke W.H. Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy // *J. Mol. Med.* 2003. Vol. 81, N 4. P. 235–245.

Ellouali M., Boisson-Vidal C., Jozefonvicz J. Antiproliferative effect and interaction of fucans with cells // *Colloid Surf. B-Biointerfaces.* 1994. Vol. 2, N 1–2. P. 305–314.

Elyakova L.A., Sova V.V., Vaskovsky V.E. Cellulase of marine mollusk *Littorina* sp. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1968. Vol. 167, N 2. P. 462–464.

Esterbauer H., Wag G., Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis // *Brit. Med. Bull.* 1993. Vol. 49, N 3. P. 566–576.

Eteshola E., Karpasas M., Arad S. et al. Red Microalga exopolysaccharides: 2. Study of the rheology, morphology and thermal gelation of aqueous preparations // *Acta Polym.* 1998. Vol. 49, N 10–11. P. 549–556.

Evans L.V., Simpson M., Callow M.E. Sulfated polysaccharide synthesis in brown algae // *Planta.* 1973. Vol. 110, N 3. P. 237–252.

Farquhar C., Dickinson A., Bruce M. Prophylactic potential of pentosan polysulfate in transmissible spongiform encephalopathies // *Lancet.* 1999. Vol. 353, N. 9147. P. 117.

Fehrenbacher N., Jaattela M. Lysosomes as targets for cancer therapy // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65, N 8. P. 2993–2995.

Finch P., Percival E., Slaiding I.R. Carbohydrates of the antarctic brown

seaweeds *Ascoseira mirabilis* // *Phytochemistry.* 1986. Vol. 25, N 2. P. 443–448.

Fink M.P., Heard S.O. Laboratory models of sepsis and septic shock // *J. Surg. Res.* 1990. Vol. 49, N 2. P. 186–196.

Fitton J.H. Fucoidans: Healthful saccharides from the sea // *GlycoSci. Nutr.* 2005. Vol. 6, N 1. P. 1–6.

Foley S.A., Szegezdi E. Mulloy B. et al. An unfractionated fucoidan from *A. nodosum*: extraction, characterization and apoptotic effects *in vitro* // *J. Nat. Prod.* 2011. Vol. 74, N 9. P. 1851–1861.

Fonseca R.J.C., Santos G.R.C., Muraio P.A.S. Effects of polysaccharides enriched in 2,4-disulfated fucose units on coagulation, thrombosis and bleeding. Practical and conceptual implications // *Thromb. Haemost.* 2009. Vol. 102, N 5. P. 829–836.

Frantz S., Vincent K.A., Feron O. et al. Innate immunity and angiogenesis // *Circ. Res.* 2005. Vol. 96, N 1. P. 15–26.

Fraser J., Straus D., Weiss A. Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression // *Immunol. Today.* 1993. Vol. 14, N 7. P. 357–362.

Fritzsche J., Alban S., Ludwig R.J. et al. The influence of various structural parameters of semisynthetic sulfated polysaccharides on the P-selectin inhibitory capacity // *Biochem. Pharmacol.* 2006. Vol. 72, N 4. P. 474–485.

Fucahori S., Yano H., Akiba J. et al. Fucoidan, a major component of brown seaweed, prohibits the growth of human cancer cell lines *in vitro* // *Mol. Med. Rep.* 2008. Vol. 1, N 4. P. 537–542.

Fudjita D. Current status and problems of the Isoyake in Japan // *Bull. Fish. Res. Agen.* 2010, N 32. P. 33–42.

Furukawa S., Fujikawa T., Koga D., et al. Purification and some properties of exo-type fucoidanases from *Vibrio* sp. N-5 // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1992. Vol. 56, N 11. P. 1829–1834.

Gallaher D.D., Gallaher C.M., Mahrt G.J. et al. A glucomannan and chitosan fiber supplement decreases plasma cholesterol and increases cholesterol excretion in overweight normocholesterolemic humans // *J. Am. Coll. Nutr.* 2002. Vol. 21, N 5. P. 428–433.

Galon J., Costes A., Sanchez-Cabo F. et al. Type, density and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome // *Science.* 2006. Vol. 313, N 5795. P. 1960–1964.

Gando S., Kameue T., Nanzaki S. et al. Disseminated intravascular coagulation is a frequent complication of systemic inflammatory response syndrome // *Thromb. Haemost.* 1996. Vol. 75, N 2. P. 224–228.

Garcia-Villalon D., Gil-Fernandez C. Antiviral activity of sulfated polysaccharides against African swine fever virus // *Antiviral. Res.* 1991. Vol. 15, N 2. P. 139–148.

Gately S., Li W.W. Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy // *Semin. Oncol.* 2004. Vol. 31, N 2. P. 2–11.

Gavrilovskaya I., Brown E., Ginsberg M. et al. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta (3) integrins // *J. Virol.* 1999. Vol. 73, N 5. P. 3951–3959.

Gerard C., Bruyns C., Marchant A. et al. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia // *J. Exp. Med.* 1993. Vol. 177, N 2. P. 547–550.

Geresh S., Arad S. The extracellular polysaccharide of red microalgae: chemistry and rheology // *Bioresour. Technol.* 1991. Vol. 38, N 2–3. P. 195–201.

Ghosh T., Chattopadhyay K., Marschall M. et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: from structure- activity analysis to clinical evaluation // *Glycobiology.* 2009. Vol. 19, N 1. P. 2–15.

Giblin P.A., Hwang S.T., Katsumoto T.R. et al. Ligation of L-selectin on T-lymphocytes activates beta-1-integrins and promotes adhesion to fibronectin // *J. Immunol.* 1997. Vol. 159, N 7. P. 3498–3507.

Gibson G.R., Roberfroid M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics // *J. Nutr.* 1995. Vol. 125, N 6. P. 1401–1412.

Gideon T.P., Rengasamy P. Toxicological evaluation of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* // *J. Med. Food.* 2008. Vol. 11, N 4. P. 638–642.

Giesen P.L., Rauch U., Bohrmann B. et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. N 5. P. 2311–2315.

Girardin S.E., Boneca I.G., Carneiro A.M. et al. NOD1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan // *Science.* 2003. Vol. 300, N 5625. P. 1584–1587.

Gochfeld D.J., El Sayed K.A., Yousaf M. et al. Marine natural products as lead anti-HIV agents // *Mini Rev. Med. Chem.* 2003. Vol. 13, N 5. P. 401–424.

Godel H.C. In Heparin: Chemical and biological properties. Clinical applications / Ed. D. A. Lane, U. Lindahl. London: CRC Press, 1989. P. 533–548.

Godfrey D.I., McConville M.J., Pellicci D.G. Chewing the fat on natural killer T cell development // *J. Exp. Med.* 2006. Vol. 203, N 10. P. 2229–2232.

Goodman S.G., Fitchett D., Armstrong P.W. et al. Randomized evaluation of the safety and efficacy of enoxaparin versus unfractionated heparin in high-risk patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes receiving the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor eptifibatid // *Circulation.* 2003. Vol. 107, N 2. P. 238–244.

Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity // *Nat. Rev. Immunol.* 2005. Vol. 5, N 12. P. 953–964.

Gotto A.M.Jr., Whitney E, Stein E.A. et al. Relation between baseline and

on-treatment lipid parameters and first acute major coronary events in the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). *Circulation.* 2000. Vol. 101, N 5. P. 477–484.

Gouin-Thibault I., Pautas E., Siguret V. Safety profile of different low-molecular weight heparins used at therapeutic dose // *Drug Saf.* 2005. Vol. 28, N 4. P. 333–349.

Grace K.S., Bronson R.A., Ghebrehiwet B. Surface expression of complement receptor gC1q-R/p33 is increased on the plasma membrane of human spermatozoa after capacitation // *Biol. Reprod.* 2002. Vol. 66, N 3. P. 823–829.

Granert C., Raud J., Waage A. et al. Effect of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit // *Infect. Immun.* 1999. Vol. 67, N 5. P. 2071–2074.

Granert C., Raud J., Xie X., Lindquist L. et al. Inhibition of leukocyte rolling with polysaccharide fucoidin prevents pleocytosis in experimental meningitis in the rabbit // *J. Clin. Invest.* 1994. Vol. 93, N 3. P. 929–936.

Grauffel V., Kloareg B., Mabeau S. et al. New natural polysaccharides with potent antithrombotic activity: fucans from brown algae // *Biomaterials.* 1989. Vol. 10, N 6. P. 363–368.

Green D., Reed J. Mitochondria and apoptosis // *Science.* 1998. Vol. 281. P. 1309–1312.

Green J.R., Stafford C.J., Jones J.L. et al. Binding of monoclonal antibodies to vegetative tissue and fucose-containing polysaccharides of *Fucus serratus* // *New Phytol.* 1993. Vol. 124, N 3. P. 397–408.

Guimaraes M.A., Mourao P.A. Urinary excretion of sulfated polysaccharides administered to Wistar rats suggests a renal permselectivity to these polymers based on molecular size // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. Vol. 1335, N 1–2. P. 161–172.

Gunay N.S., Linhardt R. Heparinoids: structure, biological activities and therapeutic application // *Planta Medica.* 1999. Vol. 65, N 4. P. 301–306.

Gupta S., Srivastava M., Ahmad N. et al. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma // *Prostate.* 2000. Vol. 42, N 1. P. 73–78.

Gyamfi M.A., Ohtani I.I., Shinno E. et al. Inhibition of glutathione S-transferase by thoningianin A, isolated from the African medicinal herb *Thonningia sanguine*, *in vitro* // *Food Chem. Toxicol.* 2004. Vol. 42, N 9. P. 1401–1408.

Hack C.E., Poll T., Thijs L. G. Sepsis and coagulation // *Sepsis.* 1999. Vol. 3, N 2. P. 85.

Hall G., Lang D., Qiu X. et al. Effect of native fucoidan, sulfated fucoidan, heparin and 6-aminohexanoic acid on the activation of glutamic-plasminogen by urokinase: role of NaCl // *Blood. Coagul. Fibrinolysis.* 2006. Vol. 17, N 4.

P. 277–281.

Hall P.R., Hjelle B., Brown D.C. et al. Multivalent presentation of antihantavirus peptides on nanoparticles enhances infection blockade // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. Vol. 52, N 6. P. 2079–2088.

Hallwell B. Antioxidants in human health and disease // *Annu. Rev. Nutr.* 1996. Vol. 16, N 1. P. 33–50.

Han L.K., Kensaku G., Hiromichi O. Anti-obesity effects of fucoidan prepared from *Cladosiphon okamuranus* tokida (Okinawamozuku) // *Jap. J. Constitut. Med.* 2004. Vol. 66, N 1-2. P. 55–60.

Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // *Cell.* 2000. Vol. 100, N 1. P. 57–70.

Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology / ed. by A. Richmond. — Oxford :Wiley-Blackwell. 2003. 588 p. ISBN 978-0-632-05953-9.

Haneji K., Matsuda T., Tomita M. et al. Fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* Tokida induces apoptosis of human T-cell leukemia virus ty-pe1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells // *Nutr. Cancer.* 2005. Vol. 52, N 2. P. 189–201.

Hang D., Choi H.S., Kang S.C. et al. Effect of fucoidan on NO production and phagocytosis of macrophages and the proliferation of neuron cells // *J. Food Sci. Nutr.* 2005. Vol. 10, N 4. P. 344–348.

Hansson G.K., Edfeldt K. Toll to be paid at the gateway to the vessel wall // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005. Vol. 25, N 6. P. 1085–1087.

Harden E.A., Falshaw R., Carnachan S.M. et al. Virucidal activity of polysaccharide extracts from four algal species against herpes simplex virus // *Antiviral Research.* 2009. Vol. 83, N 3. P. 282–289.

Haroun-Bouhedja F., Ellouali M., Siquin C. et al. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans // *Thromb. Res.* 2000. Vol. 100, N 5. P. 453–459.

Harvey D.J. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates // *Mass Spectrom. Rev.* 1999. Vol. 18, N 6. P. 349–450.

Harvey D.J. Quantitative aspects of the matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry of complex oligosaccharides // *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 1993. Vol. 7, N 7. P. 614–619.

Hasegawa Y. Progress of *Laminaria* cultivation in Japan // *J. Fish. Res. Board Can.* 1976. Vol. 33, N 4. P. 1002–1006.

Hasui M., Matsuda M., Okutani K. et al. *In vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses // *Int. J. Biol. Macromol.* 1995. Vol. 17, N 5. P. 293–297.

Haverkamp D., Hutten B.A., Buller H.R. et al. The use of specific antidotes

as a response to bleeding complications during anticoagulant therapy for venous thromboembolism // *J. Tromb. Haemost.* 2003. Vol. 1, N 1. P. 69–73.

Hayashi K., Nakano T., Hasimoto M. Defensive effect of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection // *Int. Immunopharmacol.* 2008. Vol. 8, N 1. P. 109–116.

Heinzelmann M., Bosshart H. Fondaparinux sodium lacks immunomodulatory effects of heparin // *Am. J. Surg.* 2004. Vol. 187, N 1. P. 111–113.

Heinzelmann N., Polk H.C.J., Miller F.N. Modulation of lipopolysaccharide-induced monocyte activation by heparin-binding protein and fucoidan // *Infect. Immun.* 1998. Vol. 66, N 12. P. 5842–5847.

Hemmingson J.A., Falshaw R., Furneaux R.H. et al. Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta) // *J. Appl. Phycol.* 2006. Vol. 18, N 2. P. 185–193.

Hengarten M.O. The biochemistry of apoptosis // *Nature.* 2000. Vol. 407, N 6805. P. 770–776.

Hidari K.I., Takahashi N., Arihara M. et al. Structure and anti-dengue activity of sulfated polysaccharide from a marine alga // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol. 376, N 1. P. 91–98.

Hillenkamp F., Karas M. Mass-Spectrometry of Peptides and Proteins by Matrix-Assisted Ultraviolet-Laser Desorption Ionization // *Methods Enzymol.* 1990. Mass Spectrometry Vol. 193. P. 280–295.

Hirose Y., Chiba K., Karasugi T. et al. A functional polymorphism in THBS2 that affects alternative splicing and MMP binding as associated with lumbar-disc herniation // *Am. J. Hum. Genet.* 2008. Vol. 82, N 5. P. 1122–1129.

Hirsh J., Warkentin T.E., Shaughnessy S.G. et al. Heparin and low-molecular-weight heparin. Mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy and safety // *Chest.* 2001. Vol. 119, N 1. P. 64S–94S.

Hlawaty H., Suffce N., Sutton A. et al. Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2- expression // *Biochem. Pharmacol.* 2011. Vol. 81, N 2. P. 233–243.

Hochrein H.O., O’Keeffe M. Dendritic cell subsets and toll-like receptors // *Handbook of Experimental Pharmacology* / ed. K. Starke. Berlin: Springer, 2008. Vol. 183. P. 153–179.

Hoebe K., Janssen E., Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity // *Nat. Immunol.* 2004. Vol. 5, N 10. P. 971–974.

Holtkamp A. Isolation, characterization, modification and application of fucoidan from *Fucus vesiculosus* : diss. ... dr. rer. nat. [Электронный ресурс]. Braunschweig, 2009. 179 p. Режим доступа : <http://d-nb.info/994544340/34>

Holtkamp A.D., Kelly S., Ulber R. et al. Fucoidans and fucoidanases-focus

on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 82, N. 1. P. 1–11.

Honya M., Mori H., Anzai M., et al. Monthly changes in the content of fucans, their constituent sugars and sulfate in cultured *Laminaria japonica* // Hydrobiologia. 1999. Vol. 399, N 4. P. 411–416.

Hoppensteadt D., Walenga J.M., Fareed J. et al. Heparin, low-molecular-weight heparins, and heparin pentasaccharide: basic and clinical differentiation // Hematol. Oncol. Clin. North. Am. 2003. Vol. 17, N. 1. P. 313–341.

Horonchik S., Tzaban O., Zaken O.B. et al. Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, N. 17. P. 17062–17067.

Hoshino T., Hayashi T., Hayashi K. et al. An antivirally active sulfated polysaccharides from *Sargassum horneri* (TURNER) C. AGARDH. // Biol. Pharm. Bull. 1998. Vol. 21, N. 7. P. 730–734.

Hosoda K. Studies on the component of Nada-Kombu *Laminaria longissima* IV. Alginic acid. // Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 1979. Vol. 45, N 2. P. 163–165.

Howayda H., Abd El-Hady, Daboor S. M. et al. Nutritive and antimicrobial profiles of some seagrasses from Bardawil lake, Egypt // Egypt. J. Aquat. Res. 2007. Vol. 33, N. 3. P. 103–110.

Hsu M.J., Lee S.S., Lee S. T. et al. Signalin mechanisms of enhanced neutrophil phagocytosis and chemotaxis by the polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* // Br. J. Pharmacol. 2003. Vol. 139, N. 2. P. 289–298.

Hu T., Liu L., Chen Y. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fraction extracted from *Undaria pinnatifida in vitro* // Int. J. Biol. Macromol. 2010. Vol. 46, N 2. P. 193–198.

Hu J.F., Geng M.Y., Zhang J.T. et al. An in vivo study of the structure-activity relationship of sulfated polysaccharide from brown algae to its antioxidant effect // J. Asian Nat. Prod. Res. 2001. Vol. 3. N 4. P. 353–358.

Huang L., Wen K., Gao X. et al. Hypolipidemic effect of fucoidan from *Laminaria japonica* in hyperlipidemic rats // Pharm. Biol. 2010a. Vol. 48, N 4. P. 422–426.

Huang S.Q., Ning Z.X. Extraction of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immune enhancement activity // Int. J. Biol. Macromol. 2010. Vol. 47, N 3. P. 336–341.

Hwang P.A., Chien S.Y., Chan Y.L. et al. Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory responses by *Sargassum hemiphyllum* sulfated polysaccharide extract in RAW 264.7 macrophage cells // J. Agric. Food Chem. 2011. Vol. 15, N 2. P. 2062–2068.

Hwang P.A., Wu C.H., Gau S.Y. et al. Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum hemiphyllum* // J.

Marine Science and Technology. 2010. Vol. 18, N 1. P. 41–46.

Hyun J.H., Kim S.C., Kang J. . et al. Apoptosis inducing activity of fucoidan in HCT-15 colon carcinoma cells // Biol. Pharm. Bull. 2009. Vol. 32, N 10. P. 1760–1764.

Ibtissam C., Hassane R., Jose M.L. et al. Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco // Afr. J. Biotechnol. 2009. Vol. 8, N 7. P. 1258–1262.

Ikeda H., Chamoto K., Tsuji T. et al. The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy // Cancer Sci. 2004. Vol. 95, N 9. P. 697–703.

Infanger M., Kossmehl P., Shakibaei M. et al. Vascular endothelial growth factor inhibits programmed cell death of endothelial cells induced by clinorotation // J Gravit. Physiol. 2004. Vol. 11, N 2. P. 199–200.

Inohara N., Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis // Natur. Rev. 2003. Vol. 3. N 5. P. 371–382.

Irhimeh M.R., Fitton J.H., Lowenthal R.M. et al. A quantitative method to detect fucoidan in human plasma using a novel antibody // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 2005. Vol. 27, N 10. P. 705–710.

Ishihara K., Oyamada C., Matsushima R. et al. Inhibitory effect of porphyran, prepared from dried “Nori”, on contact hypersensitivity in mice // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2005. Vol. 69, N 10. P. 1824–1830.

Ishihara Y., Matsunaga K., Kagawa J. C-C and C-X-C chemokine synthesis and release via receptors by human alveolar macrophages treated with three types of stimulants // Molecular Toxicol. 1999. Vol. 12, N 4. P. 213–223.

Ishiwatari-Hayasaka H., Kaweshima H. Osawa T. et al. Induction of cell death by chimeric L-selectin-Fas receptor // Int. Immunol. 1997. Vol., N 4. P. 627–635.

Itoh H., Noda H., Amano H. et al. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae // Anticancer Res. 1993. Vol. 13, N. 6A. P. 2045–2052.

Iwamoto K., Hiragun T., Takahagi S., Y. et al. Fucoidan suppresses IgE production in peripheral blood mononuclear cells from patients with atopic dermatitis // Arch. Dermatol. Res. 2011. Vol. 303, N 6. P. 425–431.

Jakobs F.M., Davis E.A., White T. et al. Prolonged discordant xenograft survival by inhibition of the intrinsic coagulation pathway in complement C6-deficient recipients // J. Heart Lung Transplant. 1998. Vol.17, N 3. P. 306–311.

Janeway C.A., Medzhitov R. Innate immune recognition // Annu. Rev. Immunol. 2002. Vol. 20, N 1. P. 197–216.

Jayson G.C., Gallagher J.T. Heparin oligosaccharides: inhibitors of the biological activity of bFGF on Caco-2 cells // Br. J. Cancer. 1997. Vol. 75,

N 1. P. 9–16.

Jiang Z., Okimura T., Yokose T. et al. Effects of sulfated fucan ascophyllan from the brown Alga *A. nodosum* on various cell lines: a comparative study on ascophyllan and fucoidan // *J. Biosci. Bioeng.* 2010. Vol. 110, N 1. P. 113–117.

Jiao G., Yu G., Zhang J. et al. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae // *Mar. Drugs.* 2011. Vol. 9, N 2. P. 196–223.

Jimenez-Escrig A., Sanchez-Muniz F. Dietary fiber from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism // *Nut. Res.* 2000. Vol. 20, N 4. P. 585–598.

Jin J.O., Park H.Y., Xu Q. et al. Ligand of scavenger receptor class A indirectly induces maturation of human blood dendritic cells via production of tumor necrosis factor- α // *Blood.* 2009. Vol. 113, N 23. P. 5839–5847.

Jin J.O., Song M.G., Kim Y.N. et al. The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: involvement of ERK1/2, JNK, glutathione and nitric oxide // *Mol. Carcinog.* 2010. Vol. 49, N 8. P. 771–782.

Jobin C., Bradham C.A., Russo M.P. et al. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappaB activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity // *J. Immunol.* Vol. 163, N 6. P. 3474–3483.

Jothisarawathi S., Babu B., Rengasamy R. Seasonal studies on alginate and its composition II: *Turbinaria conoides* (J.Ag.) Kutz. (Fucales, Phaeophyceae) // *J. Appl. Phycol.* 2006. Vol. 18, N 2. P. 161–166.

Jung Y.D., Ellis L.M. Inhibition of tumour invasion and angiogenesis by epigallocatechin gallate, a major component of green tea // *Int. J. Exp. Pathol.* 2001. Vol. 82, N 6. P. 309–316.

Kaikkonen J., Tuomainen T.P., Nyyssonen K. et al. Coenzyme Q10: absorption, antioxidative properties, determinants and plasma levels // *Free Radic. Res.* 2002. Vol. 36, N 4. P. 389–397.

Karmakar P., Ghosh T., Sinha S. et al. Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastromatica*: characterization of a sulfated fucan // *Carbohydr. Polym.* 2009. Vol. 78, N 3. P. 416–421.

Kaminski H.J., Li Z., Richmonds C. et al. Complement regulators in extraocular muscle and experimental autoimmune myasthenia gravis // *Exp. Neurol.* 2004. Vol. 189, N 2. P. 333–342.

Kang C.H., Choi Y.H., Choi I.W. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2 and TNF α expression by aqueous extract of *Orixa japonica* in RAW 264.7 cells via suppression of NF-kB activity // *Trop. J. Pharm. Res.* 2011. Vol. 10, N 2. P. 161–168.

Kang J.Y., Khan M.N., Park N.H. et al. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activities of the *Sargassum fulvellum* and *Sargassum thunbergii*

in mice // *J. Ethnopharmacol.* 2008. Vol. 116, N 1. P. 187–190.

Kantachumpoo A., Chirapart A. Components and antimicrobial activity of polysaccharides extracted from Thai brown seaweeds // *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 2010. Vol. 44, N 2. P. 220–233.

Kanzler H., Barrat F.J., Hessel E.M. et al. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists // *Nat. Med.* 2007. Vol. 13, N 5. P. 552–559.

Kar S., Sharma G., Das P.K. Fucoidan cures infection with both antimony-susceptible and -resistance of *Leishmania donovani* through Th1 response and macrophage - derived oxidants // *J. Antimicrob. Chemother.* 2011. Vol. 66, N 3. P.618–625.

Karas M., Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons // *Anal. Chem.* 1988. Vol. 60, N 20. P. 2299–2301.

Karas M., Bachmann D., Bahr U. et al. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 1987. Vol. 78, N 1. P. 53–68.

Karlsson N.G., Karlsson H., Hansson G.C. Sulphated mucin oligosaccharides from porcine small intestine analysed by four-sector tandem mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 1996. Vol. 31, N 5. P. 560–572.

Karmakar P., Pujol C.A., Damonte E.B. et al. Polysaccharides from *Padina tetrastromatica*: structural features, chemical modification and antiviral activity // *Carbohydr. Polym.* 2010. Vol. 80, N 2. P. 514–520.

Karnjanapratum S., Tabarsa M., Cho M.L. et al. Characterization and immunomodulatory activities of sulfated polysaccharides from *Capsosiphon fulvescens* // *Int. J. Biol. Macromol.* 2012. Vol. 51, N 5. P. 720–729.

Katayama S., Nishio T., Kishimura H. et al. Immunomodulatory properties of highly viscous polysaccharide extract from the *Gagome alga* (*Kjellmaniella crassifolia*) // *Plant Foods Hum. Nutr.* 2012. Vol. 67, N 1. P. 76–81.

Katsuraya K., Nakashima H., Yamamoto N. et al. Synthesis of sulfated oligosaccharide glycosides having high anti-HIV activity and the relationship between activity and chemical structure // *Carbohydr. Res.* 1999. Vol. 315, N 3–4. P. 234–242.

Kaufmann S.H., Hengartner M.O. *Programmed* cell death: alive and well in the new millennium // *Trends Cell Biol.* 2001. Vol. 11, N 12. P. 526–534.

Kawamoto H., Miki Y., Kimura T. et al. Effects of fucoidan from Mozuku on human stomach cell lines // *Food Sci. Technol. Res.* 2006. Vol. 12, N 3. P. 218–222.

Kerr R., Stirling D., Ludlam C.A. Interleukin-6 and haemostasis // *Brit. J. Haematol.* 2001. Vol. 115, N 1. P. 3–12.

Khotimchenko Y.S., Khozhaenko E.V., Khotimchenko M.Y. et al. Carragenans

as a new source of drugs with metal binding properties // *Mar. Drugs*. 2010. Vol. 8, N 4. P. 1106–1121.

Kim E.J., Park S.Y., Lee J.Y. et al. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells [Электронный ресурс] // *BMC Gastroenterol*. 2010. Vol. 10, N 8. Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-230X-10-96.pdf>

Kim I.H., Lee J.H. Antimicrobial activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from macroalgae // *J. Industr. Eng. Chem*. 2008. Vol. 14, N 5. P. 568–572.

Kim K.J., Lee O.H., Lee H.H. et al. A 4-week repeated oral dose toxicity study of fucoidan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* in Sprague-Dawley rats // *Toxicol*. 2010. Vol. 267, N 1-3. P. 154–158.

Kim M.H., Joo H.G. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cells // *Immunol. Lett*. 2008. Vol. 115, N 2. P. 138–143.

Kim M.J., Chang U.G., Lee J.S. Inhibitory effects of fucoidan in 3T3-L1 adipocyte differentiation // *Mar. Biotechnol*. 2009. Vol. 11, N 5. P. 557–562.

Kimura C., Koyama T., Oike M. et al. Hypotonic Stress-Induced NO Production in Endothelium Depends on Endogenous ATP // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2000. V. 274, N 3. P. 736–740.

Kirschke H. Lysosomal cysteine peptidases and malignant tumours // *Adv. Exp. Med. Biol*. 1997. Vol. 421. P. 253–257.

Kitamura K., Matsuo M., Yasui T. Fucoidan from brown seaweed *Laminaria angustata* var. *Longissima* // *Agric. Biol. Chem*. 1991. Vol. 55, N 2. P. 615–616.

Kitamura K., Matsuo M., Yasui T. Enzymatic degradation of fucoidan by fucoidanase from the hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis* // *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1992. Vol. 56, N 3. P. 490–494.

Kloager B., Quatrano R. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides // *Oceanogr. Mar. Biol.*, 1988. Vol. 26. P. 259–315.

Kloreg B., Demarty M., Mabeau S. Polyanionic characteristic of purified sulphated homofucans from brown algae // *Int. J. Biol. Macromol*. 1986. Vol. 8, N 6. P. 380–386.

Klumpp D.J., Weiser A.C., Sengupta S. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* potentiates type 1 pilus – induced apoptosis by suppressing NF- κ B // *Infect. Immun*. 2001. Vol. 69, N 11. P. 6689–6695.

Knekt P., Jarvinen R., Reunanen A. et al. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: Cohort study // *Brit. Med. J*. 1996. Vol. 312, N 7029. P. 478–480.

Knochenmuss R.A. quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization // *Mass Spectrom. J*. 2002. Vol. 37, N 8. P. 867–877.

Ko E.J., Joo H.G. Fucoidan Enhances the Survival and Sustains the Number of

Splenic Dendritic Cells in Mouse Endotoxemia // *Korean J. Physiol. Pharmacol*. 2011. Vol. 15, N 2. P. 89–94.

Ko E.J., Joo H.G. Immunomodulatory effect of fucoidan on mouse splenocytes // *Lab. Animal. Research*. 2009. Vol. 25, N 3. P. 195–200.

Koch A., Ziegler S., Breitschwerdt H. et al. Low molecular weight heparin and unfractionated heparin in thrombosis prophylaxis // *Thrombosis Research*. 2001. Vol. 102, N 4. P. 295–309.

Kokkaliari M., Farribe O., Berry M., Baum H. Serum catalase as the protective agent against inactivation of α 1-proteinase inhibitor by hydrogen peroxide: Comparison between normal and rheumatoid sera // *Biochem. Int*. 1992. Vol. 28, N 2. P. 219–227.

Koyanagi S., Tanigawa N., Nakagawa H. et al. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities // *Biochem Pharmacol*. 2003. Vol. 65, N 2. P. 173–179.

Krakauer T. Molecular therapeutic targets in inflammation: cyclooxygenase and NF- κ B // *Curr. Drug. Targets Allergy*. 2004. Vol. 3, N 3. P. 317–324.

Krautkramer E., Zeier M. Hantavirus causing hemorrhagic fever with renal syndrome enters from the apical surface and requires decay-accelerating factor (DAF/CD55) // *J. Virol*. 2008. Vol. 82, N 9. P. 4257–4264.

Krieg A.M., Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity // *Immunol Rev*. 2007. Vol. 220, N 1. P. 251–269.

Krylov V.B., Ustyuzhanina N.E., Grachev A.A. et al. Synthesis of large fucoidan fragments – potential inhibitors of microbial adhesion // 4th Baltic meeting on Microbial Carbohydrates, September 19-22, 2010, Hyytiälä. Finland. , Hyytiälä, 2010. P. 50.

Kuitunen A., Suojaranta-Ylinen R., Raivio P. et al. Heparin-induced thrombocytopenia following cardiac surgery is associated with poor outcome // *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth*. 2007. Vol. 21, N 1. P. 18–22.

Kulicke W.M., Lettau A.I., Thielking H. Correlation between immunological activity, molar mass and molecular structure of different 1,3- β -D-glucans // *Carbohydr. Res*. 1997. Vol. 272, N 2. P. 135–143.

Kumagai Y., Takeuchi O., Akira S. Pathogen recognition by innate receptors // *J. Infect. Chemother*. 2008. Vol. 14, N. 2. P. 86–92.

Kumar C.S., Ganesan P., Bhaskar N. *In vitro* antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India // *Food Chem*. 2008. Vol. 107, N 2. P. 707–713.

Kumar P., Miller A.I., Polverini P. p38 MAPK mediates γ -irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bcl-2 pathway // *J. Biol. Chem*. 2004. Vol. 279, N 41. P. 43352–43360.

Kurt-Jones E.A., Popova L., Kwinn L. et al. Pattern recognition receptors

TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus // Nat. Immunol. 2000. Vol. 1, N 5. P. 398–401.

Kusaykin M., Bakunina I., Sova V. et al. Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds // Biotechnol J. 2008. Vol. 3, N 7. P. 904–915.

Kusaykin M.I., Chizhov A.O., Grachev A.A. et al. A comparative study of specificity of fucoidanases from marine microorganisms and invertebrates // J. Appl. Phycol. 2006. Vol. 18, N 1. P. 369–373.

Kwak K.W., Cho K.S., Hahn O.J. et al. Biological effects of fucoidan isolated from *Fucus vesiculosus* on thrombosis and vascular cells // Korean J. Hematol. 2010. Vol. 45, N. 1. P. 51–57.

Kylin H. Zur Biochemie der Meeresalgen // Z. Physiol. Chem. 1913. Vol. 83, N 3. P. 171–197.

Lane C.E., Mayes C., Druehl L.D. et al. A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic reorganization // J. Phycol. 2006. Vol. 42, N. 2. P. 493–512.

Lang D., Williams T., Phillips A. et al. Mechanism of the stimulatory effect of native fucoidan, highly sulfated fucoidan and heparin on plasminogen activation by tissue plasminogen activator: the role of chloride // Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet. 2004. Vol. 29, N. 4. P. 269–275.

Larsen B., Haug A., Painter T. Sulfated polysaccharides in brown algae. III. The native state of fucoidan in *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus* // Acta. Chem. Scand. 1970. Vol. 24, N 9. P. 3339–3352.

Latifi S.Q., O’Riordan M.A., Levine A.D. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock // Infect. Immun. 2002. Vol. 70, N 8. P. 4441–4446.

Laurent-Matha V., Maruani-Herrmann S., Prebois C. et al. Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth // J. Cell Biol. 2005. Vol. 168, N 3. P. 489–499.

Le Tutour B., Benslimane F., Gouleau M.P., et al. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himantalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum* // J. Appl. Phycol. 1998. Vol. 10, N 2. P. 121–129.

Lee J.B., Hayashi K., Hashimoto M. et al. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu) // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 2004. Vol. 52, N 9. P. 1091–1094.

Lee J.B., Hayashi K., Maeda M. et al. Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae // Planta Med. 2004. Vol. 70, N 9. P. 813–817.

Lee J.B., Otha Y., Hayashi K., Hayashi T. Immunostimulating effects of a sulfated galactan from *Codium fragile* // Carbohydr. Res. 2010. Vol. 345, N 10. P.1452–1454.

Lee J.H., Shim J.S., Lee J.S. et al. Inhibition of pathogenic bacterial adhesion by acidic polysaccharide from green tea (*Camelia sinensis*)// J. Agric. Food Chem. 2006. Vol. 54, N 23. P. 8717–8723.

Lee N.Y., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N. et al. Inhibitory effect of fucoidan on activation of epidermal growth factor receptor and cell transformation in JB6 C141 cells // Food Chem. Toxicol. 2008. Vol. 46, N 5. P. 1793–1800.

Lee N.Y., Ermakova S.P., Choi H.K. et al. Fucoidan from *L. cichorioides* inhibits AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cells // Mol Carcinogen. 2008. Vol. 47, N 8. P. 629–637.

Leff J.A., Day C.E., McCord J.M. et al. Serum antioxidants as predictors of adult respiratory distress syndrome in patients with sepsis // Lancet. 1993. Vol. 341, N 8848. P. 777–780.

Leibrandt A., Meier C., Konig-Schuster M. et al. Iota-carrageenan is a potent inhibitor of Influenza A virus infection // PloS One. 2010. Vol. 5, N 12. P. e14320.

Leiro J.M., Castro R., Arranz J.A., Lamas J. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh // Int. Immunopharmacol. 2007. Vol. 7, N 7. P. 879–888.

Leite E.L., Medeiros M.G.L., Rocha H.A. et al. Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schoederii* // Plant Sci. 1998. Vol. 132, N 2. P. 215–228.

Leonard S.G., Sweeney T., Bahar B. et al. Effect of maternal seaweed extract supplementation on suckling, piglet growth, humoral immunity, selected microflora and immune response after an ex vivo lipopolysaccharide challenge // J. Anim. Sci. 2012. Vol. 90, N 2 P. 505–514.

Leonard S.G., Sweeney T., Bahar P. et al. Effect of dietary extracts and fish oil supplementation in sows on performance, intestinal microflora, intestinal morphology, volatile fatty acid concentrations and immune status of weaned pigs // Br. J. Nutrition. 2011. Vol. 105, N 4. P. 549–560.

Levi M., van der Poll T., ten Cate H. et al. The cytokine mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxemia // Eur. J. Clin. Invest. 1997. Vol. 27, N 1. P. 3–9.

Levi M., ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation // New England J. Med. 1999. Vol. 341, N 8. P. 586–592.

Levi M., Dorffler-Melly J., Reitsma P. et al. Aggravation of endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation and cytokine activation in heterozygous protein-C-deficient mice // Blood. 2003. Vol. 101, N 12. P. 4823–4827.

Ley K., Linnemann G., Meinen M. et al. Fucoidin, but not polyphosphomannan PPME, inhibits leukocyte rolling in venules of the rat mesentery // Blood. 1993. Vol. 81, N 1 P. 177.

Leiro J.M., Castro R., Arranz J.A. et al. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh // Int. Immunopharmacol. 2007. Vol. 7, N 7. P. 879–888.

Li D.Y., Xu Z., Zhang S.H. Prevention and cure of fucoidan of *Laminaria japonica* on mice with hypercholesterolemia // Food. Sci. 1999. Vol. 20. P. 45–46.

Li D.Y., Xu Z., Huang L.M. et al. Effect of fucoidan of *Laminaria japonica* on rats with hyperlipidemia // Food. Sci. 2001. Vol. 22. P. 92–95.

Li B., Lu F., Wei X. et al. Fucoidan: structure and bioactivity // Molecules. 2008. Vol. 13, N 8. P. 1671–1695.

Li C.Y., Shan S., Cao Y., Dewhirst M. Role of incipient angiogenesis in cancer metastasis // Cancer Metastasis Rev. 2000. Vol. 19, N 1-2. P. 7–11.

Li D., Xu R., Zhou Y. et al. Effects of fucoidan extracted from brown seaweed on lipid peroxidation in mice // Acta Nutrimenta Sin. 2002. Vol. 24, N 4. P. 389–392.

Li H., Lindenmeyer F., Grenet C. et al. AdTIMP-2 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, and prolongs survival in mice // Hum. Gene Ther. 2001. Vol. 12, N 5. P. 515–526.

Li B., Wei, X.J., Sun, J.L., et al. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme* // Carbohydr. Res. 2006. Vol. 341, N 9. P. 1135–1146.

Liao H., Banbury L.K., Leach D.N. Antioxidant activity of 45 Chinese herbs and the relationship with their TMC characteristics // Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2008. Vol. 5, N 4. P. 429–434.

Lim B.L., Ryu I.H. Purification, structural characterization, and antioxidant activity of red seaweed *Gloiopeltis tenax* // J. Med. Food. 2009. Vol. 12, N 2. P. 442–451.

Lin P.H., Sinha U., Betz A. Antithrombin binding of low molecular weight heparins and inhibition of factor Xa // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1526, N 1. P. 105–113.

Lindahl M., Tagesson C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A2 // Inflammation. 1997. Vol. 21, N 3. P. 347–356.

Linsley K.B., Chan S.Y., Chan S. et al. Applications of electrospray mass-spectrometry to erythropoietin n-linked and o-linked glycans // Anal. Biochem. 1994. Vol. 219, N 2. P. 207–217.

Liu J.C., Sempos C., Donahue R.P. et al. Joint distribution of non-HDL and LDL cholesterol and coronary heart disease risk prediction among individuals with and without diabetes // Diabetes Care. 2005. Vol. 28, N 8. P. 1916–1921.

Liu J.M., Bignon J., Haroun-Bouhedja F. et al. Inhibitory effect of fucoidan on the adhesion of adenocarcinoma cells to fibronectin // Anticancer Res. 2005. Vol. 25, N 3B. P. 2129–2133.

Liu J.M., Haroun-Bouhedja F., Boisson-Vidal C. Analysis of the in vitro inhibition of mammary adenocarcinoma cell adhesion by sulfated polysaccharides // Anticancer Res. 2000. Vol. 20, N 5A. P. 3265–3271.

Liu X.L., Liu D.Y., Wang Y.Q. et al. Immunomodulation and antitumor activity of fucoidan from *Undaria pinnatifida* in vitro // Chin. J. Microecology. 2010. Vol. 22, N 2. P. 86–92.

Lock R., Dahlgren C. Characteristic of the granulocyte chemiluminescence reaction following an interaction between human neutrophils and *Salmonella typhimurium* bacteria // APMIS. 1988. Vol. 96, N 1-6. P. 299–305.

Loke M.F., Lui S.Y., Ng B.L. Antiadhesive property of microalgal polysaccharide extract on the binding of *Helicobacter pylori* to gastric mucin // FEMS. 2007. Vol. 50, N 2. P. 231–238.

Lopaschuk G.D. Optimizing cardiac energy metabolism: how can fatty acid and carbohydrate metabolism be manipulated? // Coron. Artery Dis. 2001. Vol. 1, Suppl. 1. S. 8–11.

Lutau N., Nilsson J., Wadstrom T., Ljungh A. et al. Effect of heparin, fucoidan and other polysaccharides on adhesion of enterohepatic *Helicobacter species* to marine macrophages // Appl. Biochem. Biotechnol. 2011. Vol. 164, N 1. P. 1–10.

Lynch M.B., Sweeney T., Callan J.J. et al. The effect of dietary *Laminaria*-derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilisation, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs // J. Sci. Food Agric. 2010. Vol. 90, N 3. P. 430–437.

Mabbott N.A., MacPherson G.G. Prions and their lethal journey to the brain // Nat. Rev. Microbiol. 2006. Vol. 4, N 3. P. 201–211.

Mabeau S., Kloareg B., Joseleau J.P. Fractionation and analysis of fucans from brown algae // Phytochemistry. 1990. Vol. 29, N 9. P. 2441–2445.

Mandal A.K., Puchalski J., Lemley-Gillespie S. et al. Effect of insulin and heparin on glucose-induced vascular damage in cell culture // Kidney Int. 2000. Vol. 57, N 6. P. 2492–2501.

Mandal P., Mateu C.G., Chattopadhyay K. et al. Structural features and antiviral activity of sulfated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica* // Antivir. Chem. Chemother. 2007. Vol. 18, N 3. P. 153–162.

Mantovani A. Macrophage diversity and polarization: in vivo veritas // Blood. 2006. Vol. 108, N 2. P. 408–409.

Marais M.F., Joseleau J.P. A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum* // Carbohydr. Res. 2001. Vol. 336, N 2. P. 155–159.

March D.R., Proctor L.M., Stoermer M.J. et al. Potent cyclic antagonists of the complement C5a receptor on human polymorphonuclear leukocytes. Relationship between structures and activity // Mol. Pharmacol. 2004. Vol. 65, N 4. P. 868–879.

Margret R.J., Kumaresan S., Ravicumar S. A preliminary study on the anti-inflammatory activity of methanol extract of *Ulva lactuca* in rat // J. Environ. Biol. 2009. Vol. 30, N 5. suppl. P. 899–902.

Marques C.T., Tarciana C.G., Azevedo M.S. et al. Sulfated fucans extracted from algae *Padina gymnospora* have anti-inflammatory effect // Rev. Bras. Farmacogn. 2012. Vol. 22, N 1. P. 115–122.

Marti R., Uriz M.J., Turon X. Seasonal and spatial variation of species toxicity in Mediterranean seaweed communities: correlation to biotic and abiotic factors // Mar.Ecol.Progr.Ser. 2004. Vol. 282, N 11. P. 73–85.

Martinon F., Mayor A., Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body // Annu. Rev. Immunol. 2009. Vol. 27. P. 229–265.

Maruyama H., Suzuki K., Miyai S. et al. Characterization of meFucoidan as a selective inhibitor for secretory phospholipase A2-IIA and the phosphorylation of meFucoidan-binding proteins by A-kinase in vivo // Biol. Pharm. Bull. 2008. Vol. 31, N 4. P. 714–718.

Maruyama H., Tamauchi H., Hashimoto M. et al. Antitumor activity and immune response of Mekabu fucoidan extracted from Sporophyll of *Undaria pinnatifida* // Planta Med. 2003. Vol. 17, N 3. P. 245–249.

Maruyama H., Tamauchi H., Hashimoto M. et al. Suppression of Th2 immune responses by Mekabu fucoidan from *Undaria pinnatifida sporophylls* // Int. Arch. Allergy Immunol. 2005. Vol. 137, N 4. P. 289–294.

Maruyama H., Tamauchi H., Iizuka M. et al. The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida sporophylls (Mecabu)* // Planta Med. 2006. Vol. 72, N 15. P. 1415–1417.

Maruyama H., Tanaka M., Hashimoto M. et al. The suppressive effect of Mekabu fucoidan on an attachment of *Cryptosporidium parvum* oocysts to the intestinal epithelial cells in neonatal mice // Life Sci. 2007. Vol. 80, N 8. P. 775–781.

Mackow E.R., Gavrilovskaya I.N. Cellular receptors and hantavirus pathogenesis // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2001. Vol. 256. P. 91–115.

Matsubara K., Xue C., Zhao X. et al. Effects of middle molecular weight fucoidans on *in vitro* and *ex vivo* angiogenesis of endothelial cells // Int. J. Mol. Med. 2005. Vol. 15, N 4. P. 695–699.

Matsui M.S., Muizzuddin N., Arad S. et al. Sulfated polysaccharides from red microalgae have anti-inflammatory properties *in vitro* and *in vivo* // Appl. Biochem. Biotechnol. 2003. Vol. 104, N 1. P. 13–22.

Matsumoto S., Nagaoka M., Hara T. et al. Fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus* Tokida ameliorates murine chronic colitis through the down-regulation interleukin-6 production on colonic epithelial cells // Clin. Exp. Immunol. 2004. Vol. 136, N 3. P.432–439.

Mayer A.M.S., Krotz L., Bonfil R.D. et al. Biological activity in *Macrocystis pyrifera* from Argentina: sodium alginate, fucoidan and laminaran. Antitumor, cytotoxicity and humoral immune response // Hydrobiologia. 1987. Vol. 151/152, N 1. P. 483–489.

Mazumder S., Ghosal P.K., Pujol C.A. et al. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (*Gracilariaceae, Rhodophyta*) // Int. J. Biol. Macromol. 2002. Vol. 31, N 1–3. P. 87–95.

McClure M.O., Moore J.P., Blanc D.F. et al. Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV-infection *in vitro* // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1992. Vol. 8, N 1. P. 19–26.

McCully M.E. Histological studies on the genus *Fucus*. II. Histology of the reproductive tissues // Protoplasma. 1968. Vol. 66, N 1–2. P. 205–230.

McLafferty F.W. Tandem Mass Spectrometry. New York: John Wiley & Sons, 1983. 506 p. ISBN 978-0471865971.

McLafferty F.W., Amster I.J., Baldwin M.A. et al. Mass-spectrometry combined with mass-spectrometry // Int. J. Mass Spectrom Ion Proc. 1982. Vol.45, N 10. P. 323–329.

Medcalf D.G., Larsen B. Fucose-containing polysaccharides in the brown algae *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus* // Carbohydr. Res. 1977. Vol. 59, N 2. P. 531–537.

Medcalf D.G., Schneider T.L., Barnett R.W. Structural features of a novel glucuronogalactofucan from *Ascophyllum nodosum* // Carbohydr. Res. 1978. Vol. 66, N 1. P. 167–171.

Medeiros V.P., Querez K.C., Cardoso M.L. et al. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties // Biochemistry (Moscow). 2008. Vol. 73, N 9. P. 1018–1024.

Medlin L.K., Kooistra W.H.C.F., Potter D. et al. Phylogenetic relationships of the 'golden algae' (haptophytes, heterokont chromophytes) and their plastids // Plant. Syst. Evol. 1997. Vol. 11, Suppl. P. 187–219.

Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity // Nature. 1997. Vol. 338, N 6640. P. 394–397.

Meletis J., Terpos E. Recent insights into the pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria // Med. Sci. Monit. 2003. Vol. 9, N 7. P. 161–172.

Meneghini R., Benfato M.S., Bertoncini C.R. et al. Iron homeostasis and oxidative DNA damage // Cancer J. 1995. Vol. 8, N 3. P. 109–113.

Merrel D.S., Falkow S. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis // Nature. 2004. Vol. 430, N 6996. P. 250–256.

Mhathebi L., Laroche-Clary A., Jacque R. Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities of organic fractions from the Mediterranean

brown seaweed *Cystoseira sedoides* // Can. J. Physiol. Pharmacol. 2011. Vol. 89, N 12. P. 911–921.

Miao B., Geng M., Li J. et al. Sulfated polymannuroguronate, a novel anti acquired immune deficiency syndrome (AIDS) drug candidate, targeting CD4 in lymphocytes // Biochem. Pharmacol. 2004. Vol. 68, N 4. P.641–649.

Miao B., Li J., Fu X. et al. T-cell receptor (TCR)/CD3 is involved in sulfated polymannuroguronate (SPMG)-induced T-lymphocyte activation // Int. Immunopharmacol. 2005. Vol. 5, N 7–8. P. 1171–1182.

Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm // J. Immunol. 2000. Vol. 164, N 12. P. 6166–6173.

Minamisawa T., Hirabayashi J. Fragmentations of isomeric sulfated monosaccharides using electrospray ion trap mass spectrometry // Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 2005. Vol. 19, N 13. P. 1788–1796.

Minix R., Doctor V.M. Interaction of fucoidan with proteases and inhibitors of coagulation and fibrinolysis // Thromb. Res. 1997. Vol. 87, N 5. P. 419–429.

Mizuno M., Nishitani Y., Tanoue T., et al. Quantification and localisation of fucoidan in *Laminaria japonica* using a novel antibody // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009. Vol. 73, N 2. P. 335–338.

Mizuno M., Nishitani Y., Hashimoto T. et al. Different suppressive effects of fucoidan and lentinan on IL-8 mRNA expression in in vitro gut inflammation // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2009. Vol. 73, N 10. P. 2324–2325 .

Modlin R.L., Brightbill H.D., Godowski P.J. The toll of innate immunity on microbial pathogens // N. Engl. J. Med. 1999. Vol. 340, N 23. P. 1834–1835.

Mohamed S., Hashim S.N., Rahman H.A. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy // Trends Food Sci. Technol. 2012. Vol. 23, N 2. P. 83–96.

Mohsen M.S., Asker S.F., Mohamed F.M. et al. Chemical structure and antiviral activity of water-soluble sulfated polysaccharides from *Sargassum latifolium* // J. Appl. Sci. Res. 2007. Vol. 3, N 10. P. 1178–1185.

Montecucco C., Rappuoli R. Living dangerously: how *H.pylori* survives in the human stomach // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2001. Vol. 2, N 6. P. 457–466.

Moon H.J., Lee S.H., Ku M.J. et al. Fucoidan inhibits UVB-induced MMP-1 promoter expression and down regulation of type 1 procollagen synthesis in human skin fibroblasts // Eur. J. Dermatol. 2009. V. 19, N 2. P. 129–134.

Moon H.J., Park K.S., Ku M.J. et al. Effect of *Costaria costata* fucoidan on expression of matrix metalloproteinase-1 promoter mRNA and protein // J. Nat. Prod. 2009. Vol. 72, N 10. P. 1731–1734.

Moo-Puc R., Robledo D., Frelle-Pelegrin Y. Evaluation of selected tropical seaweeds for *in vitro* anti-trichomonal activity // J. Ethnopharmacol. 2008. Vol. 120, N 1. P. 92–97.

Moore J.P., Stevenson M. New targets for inhibitors of HIV-replication // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2000. Vol. 1, N 1. P. 40–49.

Mori H., Kamei H., Nishide E. et al. Sugar constituents of some sulfated polysaccharides from the sporophylls of wakame (*Undaria pinnatifida*) and their biological activities // Mar. Algae Pharm. Sci. 1982. Vol. 2. P. 109–121.

Mosser D.M. The many faces of macrophage activation // J. Leukoc. Biol. 2003. Vol. 73, N 2. P. 209–212.

Mulloy B., Ribeiro A.C., Alves A.P. et al. Sulfated fucans from echinoderms have a regular tetrasaccharide repeating unit defined by specific patterns of sulfation at the O-2 and O-4 positions // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269, N 35. P. 22113–22123.

Murata M., Sano Y., Ishihara K. et al. Dietary Fish Oil and *Undaria pinnatifida* (wakame) synergistically decrease rat serum and liver and triacylglycerol // J. Nutr. 2002. Vol. 132, N 4. P. 742–747.

Myers S.P., O'Connor J., Fitton J.H. et al. A combined phase I and II open label study on the effects of a seaweed extract nutrient complex on osteoarthritis // Biologics. 2010, N 3. Vol. 4. P. 33.

Myers S.P., O'Connor J., Fitton J.H. et al. A combined phase I and II open-label study on the immunomodulatory effects of seaweed extract nutrient complex // Biologics. 2011. Vol. 5, N 11 . P. 45–60.

Mytar B., Gawlicka M., Szatanek R. et al. Induction of intracellular cytokine production in human monocytes/macrophages stimulated with ligands of pattern recognition receptors // Inflamm. Res. 2004. Vol. 53, N 3. P. 100–106.

Na Y.S., Kim W.J., Kim S.M. et al. Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens* // Int. Immunopharm. 2010. Vol. 10, N 3. P. 364–370.

Nader H.B., Lopes C.C., Rocha H.A. et al. Heparins and heparinoids: occurrence, structure and mechanism of antithrombotic and hemorrhagic effect activities // Curr. Pharm. Des. 2004. Vol. 10, N 9. P. 951–966.

Nagai H., Roy C.R. Show me the substrates: modulation of host cell function by type IV secretion systems // Cell. Microbiol. 2003. Vol. 5, N 6. P. 373–383.

Nagamine T., Hayakawa K., Kusakabe T. et al. Inhibitory effect of fucoidan on Huh7 hepatoma cells through down regulation of CXCL12 // Nutr. Cancer. 2009. Vol. 61, N 3. P. 340–347.

Nagaoka M., Shibata H., Kimura-Takagi I. et al. Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* Tokida // Glycoconjugate J. 1999. Vol. 16, N 1. P. 19–26.

Nagumo T., Nishino T. Fucan sulfates and their anticoagulant activities // Polysaccharides in medicinal applications / ed. S.Dumitriu. New-York; Basel; Hong-Kong: CRC Press, 1996. P. 545-574. ISBN 9780824795405.

Nakae H., Endo S., Yamada Y. et al. Bound and soluble adhesion molecule and cytokine levels in patients with severe burns // *Burns*. 2000. Vol. 26, N 2. P. 139–144.

Nakayama R., Tamura U., Kikuzaki H. et al. Antioxidant effect of the constituents of Susabinori (*Porphyra yezoensis*) // *JAOCS*. 1999. Vol. 76, N 5. P. 649–653.

Nakayasu S., Soegima R., Yamaguchi K. et al. Biological activities of fucose-containing polysaccharide ascophyllan isolated from the brown algae *Ascophyllum nodosum* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009. Vol. 73, N 4. P. 961–964.

Narazaki M., Segarra M., Tosato G. Sulfated polysaccharides identified as inducers of neuropilin-1 internalization and functional inhibition of VEGF and **semaphorin3A**Blood. 2008. Vol. 111, N 8. P. 4126–4136.

Neish A.S., Gewirtz A.T., Zeng H. et al. Procaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IκB-α ubiquitination // *Science*. 2000. Vol. 289, N 5484. P. 1560–1563.

Nikolic D.S., Garcia E., Piguet V. Microbicides and other topical agents in the prevention of HIV and sexually transmitted infections // *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2007. Vol. 5, N 1. P. 77–88.

Nishide E., Kinoshita Y., Anzai H. et al. Distribution of hot-water extractable material and alkali-soluble alginate in different parts of *Undaria pinnatifida* // *Nippon Suisan Gakkaishi*. 1988. Vol. 54, N 10. P. 1619–1622.

Nishino T., Aizu Y., Nagumo T. The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulfates from the brown seaweed *Ecklonia kurome* // *Agric. Biol. Chem.* 1991. Vol. 55, N 3. P. 791–803.

Nishino T., Fukuda A., Nagumo T. Inhibition of the generation of thrombin and factor Xa by a fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome* // *Thromb. Res.* 1999. Vol. 96, N 1. P. 37–49.

Nishino T., Nagumo T. Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans // *Carbohydr. Res.* 1992. Vol. 229, N 2. P. 355–362.

Nishino T., Nagumo T. Sugar constituents and blood - anticoagulant activities of fucose-containing sulfated polysaccharides in nine brown seaweed species // *J. Agr. Chem. Soc. Jap.* 1987. Vol. 61, N 3. P. 361–363.

Nishino T., Nishioka C., Ura H. et al. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan // *Carbohydr. Res.* 1994. Vol. 255, N 4. P. 213–224.

Nishino T., Yamauchi T., Horie M. et al. Effect of fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA // *Thromb. Res.* 2000. Vol. 99, N 6. P. 623–634.

Nishino T., Yokoyama G., Dobashi K. Isolation, purification and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities // *Carbohydr.*

Res. 1989. Vol. 186, N 1. P. 119–129.

Nishino T., Aizu Y., Nagumo T. The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity // *Thromb. Res.* 1991. Vol. 64, N 6. P. 723–731.

Nishino T., Nagumo T., Kiyohara H., et al. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* // *Carbohydr. Res.* 1991. Vol. 211, N 1. P. 77–90.

Nishino T., Takabe Y., Nagumo T. Isolation and partial characterization of a novel β-D-galactan sulfate from the brown seaweed *Laminaria angustata* var. *longissima* // *Carbohydr. Polym.* 1994. Vol. 23, N 3. P. 165–173.

Nosedo M.D., Cerezo A.S. Room-Temperature, Low-Field C-13-Nmr Spectra of Degraded Carrageenans. 3. Autohydrolysis of a Lambda Carrageenan and of Its Alkali-Treated Derivative // *Int. J. Biol. Macromol.* 1993. Vol. 15, N 3. P. 177–181.

O' Sullivan A.M., Cailaghan Y.C., Gredy M.N. et al. In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland // *Food Chem.* 2011. Vol. 126, N 3. P. 1064–1070.

O'Donnell C., Shukla D. The importance of heparan sulfate in herpesvirus infection // *Virol. Sin.* 2008. Vol. 23, N 6. P. 383–393.

Ofek I., Hasty D., Sharon N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003. Vol. 38, N 3 P. 181–191.

Okai Y., Higashi-Okai K., Ishizaka S. et al. Possible immunomodulating activities in an extract of edible brown alga, *Hijikia fusiforme* (*Hijiki*) // *J. Sci. Food Agric.* 1998. Vol. 76, N 1. P. 56–62.

Okai Y., Higashi-Okai K., Ishizaka S., Yamashita U. Enhancing effect of polysaccharides from an edible brown alga, *Hijikia fusiforme* on release of tumore necrosis factor-alpha from macrophages of endotoxin-nonresponder C3H/He mice // *Nutr. Cancer.* 1997. Vol. 27, N 1. P. 74–79.

O'Mahony R., Al-Khtheeri H., Weerasekera D. et al. Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori* // *World J. Gastroenterol.* 2005. Vol. 11, N 47. P. 7499–7507.

Ortega-Barria E., Boothroyd J.C. A Toxoplasma lectin-like activity specific for sulfated polysaccharides is involved in host cell infection // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, N 3. P. 1267–1276.

Ostergaard C., Yieng-Kow R.V., Benfield T. Inhibition of leucocyte entry into the brain by the selectin blocker fucoidin decreases interleukin-1 (IL-1) levels but increases IL-8 levels in cerebrospinal fluid during experimental pneumococcal meningitis in rabbits // *Infect. Immunol.* 2000. Vol. 68, N 6. P. 3153–3157.

Osterud B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 1998. Vol. 1, N 1. P. 9–14.

O'Sullivan L., Murphy B., McLoughlin P. et al. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications // *Mar. Drugs*. 2010. Vol. 8, N 7. P. 2038.

Ouidja M.O., Petit E., Kerros M.E. et al. Structure-activity studies of heparan mimetic polyanions for anti-prion therapies // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 363, N 1. P. 95–100.

Ozawa T., Yamamoto J., Yamagishi T. et al. Two fucoidans in the holdfast of cultivated *Laminaria japonica* // *J. Nat. Med.* 2006. Vol. 60, N 3. P. 236–239.

Paerson G.A., Brawley S.H. A model for signal transduction during gamete release in the fucoid alga *Pelvetia compressa* // *Plant Physiol.* 1988. Vol. 118, N 1. P. 305–313.

Palkama T. Induction of IL-1 production by ligands binding to the scavenger receptor in human monocytes and Th1 cell line // *Immunology*. 1991. Vol. 74, N 3. P. 432–438.

Park H.S., Kim G.Y., Nam T.J. et al. Antiproliferative activity of fucoidan was associated with the induction of apoptosis and autophagy in AGS human gastric cancer cells // *J. Food Sci.* 2011. Vol. 76, N 3. P. T77–T83.

Park H.Y., Han M.H., Park C. et al. Anti-inflammatory effect of fucoidan through inhibition of NF- κ B, MAPK and Act activation in lypopolisaccharide-induced BV2 microglia cells // *Food Chem. Toxicol.* 2011. Vol. 49, N 8. P. 1745–1752.

Park S.B., Chun K.R., Kim J.K. et al. The differential of high and low molecular weight fucoidans on the severity of collagen-induced arthritis // *Phytother. Res.* 2010. Vol. 24, N 9. P. 1384–1391.

Pasare C., Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity // *Microbes Infect.* 2004. Vol. 6, N 15. P. 1382–1387.

Pat. USA 5321133 (A), MIIK A61K31/715. Sulphated polysaccharides, anticoagulant agent and anticomplementary agent obtained from brown algae fucuses and method of obtaining same / Collic S., Breaudiere J. et al.; assignee: Ifremer [FR]. — publ. 14.06.1994.

Pat. USA 5948405 (A), MIIK A61K31/737. Fucans with low molecular weight having anticoagulant, antithrombinic and antithrombotic activity / Cedro A., Porta R. et al.; assignee: Crinos Industria Farmaco [IT]. — publ. 07.09.1999.

Pat. USA 6207652 (B2), MIIK A61K31/715, A61K31/721. Apoptosis inducers / T. Sakai, Kitano N., Yu F. et al.; assignee: Takaro Shuzo CO., LTD (JP). — publ. 27.03.2001.

Pat. USA 6277616 (B2). Endo-Fucoidan Lyase / T.Sakai, S. Takeshi, A. Kimura et al.; assignee: Takaro Shuzo CO., LTD (JP). — publ. 21.08.2001.

Pat. USA 7056520 (B2), MIIK A61K31/715. Method and composition for

the treatment of a viral infection / Fitton J., Dragar C. et al.; assignee: Fitton J., Dragar C., Marinova Party Limited. — publ. 06.06.2006.

Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T. et al. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, N. 29. P. 21770–21776.

Pawlinski R., Pedersen B., Schabbauer G. et al. Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia // *Blood*. 2004. Vol. 103, N 4. P. 1342–1347.

Percival E.E., Venegas J., Weigel H. Carbohydrates of the brown seaweed *Lessonia nigrescens* // *Phytochemistry*. 1983. Vol. 22, N 6. P. 1429–1433.

Percival E.G.V., Ross A.G. Fucoidin. Part I. The isolation and purification of fucoidin from brown seaweeds. *J. Chem. Soc.* 1950. Vol. 1950. P. 717–720.

Percival E. Glucuronoxylifucan, a cell-wall component of *Ascophyllum nodosum*. Part I // *Carbohydr. Res.* 1968. Vol. 7, N 3. P. 272–283.

Percival E. Glucuronoxylifucan, a cell-wall component of *Ascophyllum nodosum* Part II. Methylation // *Carbohydr. Res.* 1971. Vol. 17, N 1. P. 121–126.

Percival E. Carbohydrates of the brown seaweeds. Part III. *Desmarestia aculeate* // *Carbohydr. Res.* 1974. Vol. 32, N 2. P. 195–200.

Pereira M.S., Mulloy B., Mourao P.A.S. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans - Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, N 12. P. 7656–7667.

Pernerstorfer T., Hollenstein U, Hansen J. et al. Lepirudin blunts endotoxin-induced coagulation activation // *Blood*. 2000. Vol. 95, N. 5. P. 1729–1734.

Perreault H., Costello C.E. Liquid secondary ionization, tandem and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass-spectrometric characterization of glycosphingolipid derivatives // *Org. Mass Spectrom.* 1994. Vol. 29, N 12. P. 720.

Peter M.E., Dhein J., Ehret A. et al. APO-1 (CD95)-dependent antigen receptor-induced apoptosis in human T and B cell lines // *Int. Immunol.* 1995. Vol. 7, N. 11 P. 1873–1877.

Petrof E.O., Kojima K., Ropeleski M.J. et al. Probiotics inhibit nuclear factor- κ B and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition // *Gastroenterology*. 2004. Vol. 127, N 5. P. 1474–1487.

Phillips N.J., Apicella M.A., Griffiss J.M. et al. Structural Studies of the Lipooligosaccharides from *Haemophilus-Influenzae* Type-B Strain-A2 // *Biochemistry*. 1993. Vol. 32, N 8. P. 2003–2012.

Phillips N., Calhoun S., Moustafa A. et al. Genomic insights into evolutionary relationship among heterokont lineages emphasizing the *Phaeophyceae* // *J. Phycol.* 2008, N. 44. P. 15–18.

Philpott D.J., Girardin S.E. The role of Toll-like receptors and NOD proteins in bacterial infections // *Mol. Immunol.* 2004. Vol. 41, N 11. P. 1099–1108.

Pischon T., Girman C.J., Sacks F.M. et al. Non-high density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein b in the prediction of coronary heart disease in men// circulation. 2005. Vol. 112, N 11. P. 3375–3383.

Pomim V.H. Review: an overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures // *Biopolymers.* 2009. Vol. 91, N 8. P. 601–609.

Pomin V.H., Mourau P.A.S. Structure, biology, evolution and medical importance of sulfated fucans and galactans // *Glycobiology.* 2008. Vol. 18, N 12. P. 1016–1027.

Ponce N.M., Pujol C.A., Damonte E.B. et al. Fucoidans from brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies // *Carbohydr. Res.* 2003. Vol. 338., N 2. P. 153–165.

Prandoni P. Venous thromboembolism and atherosclerosis: is there a link? // *J. Thromb. Haemost.* 2007. Vol. 5, N s 1. P. 270–275.

Preeprame S., Hayashi K., Lee J.B. et al. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum hornery* // *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 2001. Vol. 49, N 4. P. 484–485.

Pujol C.A., Carlucci M.J., Matulewicz M.C., Damonte E.B. Natural sulfated polysaccharides for the prevention and control of viral infection // *Top Heterocycl. Chem.* 2007. Vol. 11, N 5. P. 259–281.

Pujol C.A., Estevez J.M., Carlucci M.J. et al. Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus // *Antivir. Chem. Chemother.* 2002. Vol. 13, N 2. P.83–89.

Ragan M.A., Jensen A. Quantitative studies on brown algal polyphenols. II. Seasonal variation in polyphenol content of *Ascophyllum nodosum* (L.) LeJol. and *Fucus vesiculosus* (L.) // *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 1978. Vol. 34, N 3. P. 245–258.

Ramamurthy N., Baliga N., Wakefield T.W. et al. Determination of low-molecular-weight heparins and their binding to protamine and a protamine analog using polyion-sensitive membrane electrodes // *Anal. Biochem.* 1999. Vol. 266, N 1. P. 116–124.

Ramberg J.E., Nelson E.D., Sinnott R.A. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature // *Nutrition J.* 2010. Vol. 9, N 54. P. 1–22.

Randhawa A.K., Hawn T.R. Toll-like receptors: their roles in bacterial recognition and respiratory infection // *Expert Rev. Antiinfect. Ther.* 2008. Vol. 6, N 4. P. 479–495.

Rashid Z.M., Lahaye E., Defer D. et al. Isolation of a sulfated polysaccharide

from a recently discovered sponge species (*Celtodoryx girardae*) and determination of its anti-herpetic activity // *Int. J. Biol. Macromol.* 2009. Vol. 44, N 3. P. 286–293.

Rechter S., Konig T., Auerochs S. et al. Antiviral activity of arthrospira-derived Spirulan-like substances // *Antivir. Res.* 2006. Vol. 72, N 3. P. 197–206.

Reinhold V.N., Reinhold B.B., Costello C. E. Carbohydrate molecular-weight profiling, sequence, linkage, and branching data - es-ms and cid // *Anal. Chem.* 1995. Vol. 67, N 11. P. 1772–1784.

Religa P., Kazi M., Thyberg J. et al. Fucoidan inhibits smooth muscle cell proliferation and reduces mitogen-activated protein kinase activity // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2000. Vol. 20, N 5. P. 419–426.

Remick D.G., Call D.R., Ebong S.J. Combination immunotherapy with soluble tumor necrosis factor receptors plus interleukin 1receptor antagonist decreases sepsis mortality // *Crit. Care Med.* 2001. Vol. 29, N 3. P. 473–481.

Reunov A., Nagorskaya V., Lapshina L. et al. Effect of κ/β -karrageenan from red alga *Tichocarpus crinitus* on infection of detached tobacco leaves with tobacco mosaic virus // *J. Plant. Dis. Protect.* 2004. Vol. 111, N 2. P. 165–172.

Reviere B., Rousseau F., Draisma S.G.A. Classification of the Phaeophyceae from past to present and current challenges // *Unraveling the algae the past, present, and future of algal systematic* / ed. J. Brodie, J. Lewis. London : CRS Press, 2007. P. 267–284.

Rhimou B., Hassane R., Bourgougnon N. Antiviral activity of *Rhodophyceae* from Morocco // *Afr. J. Biotechnol.* 2010. Vol. 9, N 46. P. 7968–7975.

Ribeiro A.C., Vieira, R.P., Mourao, P.A., et al. A sulfated alpha-L-fucan from sea cucumber // *Carbohydr. Res.* 1994. Vol. 255, N 4. P. 225–240.

Riou D., Collic-Jouault S., Pinczon du sel D. et al. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line // *Anticancer Res.* 1996. Vol. 16, N 3 P. 1213–1218.

Rioux L.E., Turgeon S.L., Beaulieu M. Structural characterization of laminaran and galactofucan extracted from the brown seaweed *Saccharina longicuris* // *Phytochemistry.* 2010. Vol. 71, N 13. P. 1586.

Rioux L.E., Turgeon S. L., Beaulieu M. Effect of season on the composition of bioactive polysaccharides from the brown seaweed *Saccharina longicuris* // *Phytochemistry.* 2009. Vol. 70, N 8. P. 1069–1075.

Roach J.C., Glusman G., Rowen L. et al. The evaluation of vertebrate Toll-like receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102, N 27. P. 9577–9582.

Robertson M.S. Heparin: the cheap alternative for immunomodulation in sepsis? // *Crit. Care Resusc.* 2006. Vol. 8, N 3. P. 235–238.

Rocha H.A., Franco C.R., Trindade E.S. et al. Fucan inhibits chinese hamster

ovary cell (CHO) adhesion to fibronectin by binding to the extracellular matrix // *Planta Med.* 2005. Vol. 71, N 7 P. 628–633.

Rocha H.A., Moraes F.A., Trindade E.S. et al. Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, N 50. P. 41278–41288.

Rocha S.M., Marques C., Guerra D.C. et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds // *J. Appl. Phycol.* 2007. Vol. 19, N 2. P. 153–160.

Rodzinski E., Jones T., Burnette W.N. et al. Antiinflammatory effect in experimental meningitis of procariotic peptides that mimic selectins // *J. Infect. Dis.* 1993. Vol. 168, N 6 P.1422.

Rogerson S.J., Chaiyaroj S.C., Ng K. et al. Chondroitin sulfate A is a cell surface receptor for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes // *J. Exp. Med.* 1995. Vol. 182, N 1. P. 15–20.

Romanos M.T.V., Andrada-Serpa M.J., Santos M.G.M. et al. Inhibitory effect of extracts of Brazilian marine algae on human T-cell lymphotropic virus Type I (HTLV-I) - induced syncytium formation *in vitro* // *Cancer Invest.* 2002. Vol. 20, N 1. P. 46–54.

Rosha de Souza M.C., Marques C.T., Guerra D.C.M. et al. Antioxidant activities sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds // *J. Appl. Phycol.* 2007. Vol. 19, N 2. P. 153–160.

Roszkowski W., Beuth L., Ko H., et al. Blocking of lectin-like adhesion molecules on pulmonary cells inhibits lung sarcoma L-1 colonization in BALB/c-mice // *Experimentia.* 1989. Vol. 45, N 6. P. 584–588.

Roy S., Nicholson D. Cross-talk in cell death signaling // *J. Exp. Med.* 2000. Vol. 192, N 8. P. 21–25.

Ruperez P., Ahrazem O., Leal J.A., Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible seaweed *Fucus vesiculosus* // *J. Agric. Food Chem.* 2002. Vol. 50, N 4. P. 840–845.

Ryan T.G., Anderson J.L., Antman E.M. et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction. a report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines (committee on management of acute myocardial infarction) // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996. Vol. 28, N 5. P. 1328–1428.

Saad O.M., Leary J.A. Delineating mechanisms of dissociation for isomeric heparin disaccharides using isotope labeling and ion trap tandem mass spectrometry // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004. Vol. 15, N 9. P. 1274–1286.

Sagawa T.I.H., Kato I. Fucoidan as functional foodstuff. Structure and biological potency // *Jap. J. Phycol.* 2003. Vol. 51. P. 19–25.

Sakai T., Ishizuka K., Shimanaka K., et al. Structures of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes // *Mar. Biotechnol.* 2003. Vol. 5, N 6. P. 536–544.

Sakai T., Kimura H., Kato I.A. marine strain of Flavobacteriaceae utilizes brown seaweed fucoidan // *Mar. Biotechnol.* 2002. Vol. 4, N 4. P. 399–405.

Salvador N., Garetta A.G., Lavelli L., Ribera M.A. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae // *Sci. Mar.* 2007. Vol. 71, N 1. P. 101–103.

Samama M.M., Bara L., Gouin-Thibault I. New data on the pharmacology of heparin and low molecular weight heparins // *Drugs.* 1996. Vol. 52, N 7. P. 8–14.

Sandkvist M. Type II secretion and pathogenesis // *Infect. Immun.* 2001. Vol. 69., N 6. P. 3523–3535.

Sasaki K., Sakai T., Kojima K. et al. Partial purification and characterization of an enzyme releasing 2-sulfo-alpha-L-fucopyranose from 2-sulfo-alpha-L-fucopyranosyl-(1->2) pyridylaminated fucose from a sea urchin, *Strongylocentrotus nudus* // *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996. Vol. 60, N 4. P. 666–668.

Sato S., Tanbara K. Distribution of metals and components of polysaccharides in *Laminaria japonica* // *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 1980. Vol. 46, N 6. P. 749.

Satoh T., Cohen H.T., Katz A.I. Intracellular signaling in the regulation of renal Na-K-ATP-ase. II. Role of eicosanoids // *J. Clin. Invest.* 1993. Vol. 91, N 2. P. 409–415.

Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A. et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways // *EMBO J.* 1998. Vol. 17, N 6. P. 1675–1687.

Schaeffer D.J., Krylov V.S. Anti HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2000. Vol.45, N 3. P. 208–227.

Schepetkin I.A., Faulkner C.L., Nelson-Overton L.K. et al. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum* // *Int. Immunopharmacol.* 2005. Vol. 5, N 13. P. 1783–1799.

Schick B.P., Maslow D., Moshinski A., San Antonio J.D. Novel concatameric heparin-binding peptides reverse heparin and low-molecular-weight heparin anticoagulant activities in patient plasma *in vitro* and in rats *in vivo* // *Blood.* 2004. Vol. 103, N 4. P. 1356–1363.

Schweiger R.G. Methanolysis of fucoidan. II. The presence of sugars other than L-fucose // *J. Org. Chem.* 1962. Vol. 27, N 12. P. 4270–4276.

Senni K., Gueniche F., Foucault-Bertaud A. et al. Fucoidan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue proteolysis // *Arch. Biochem. Biophys.* 2006. Vol. 445, N 1. P. 56–64.

Senni K., Gueniche F., Foucault-Bertaud A. et al. Fucoidan a sulfated polysaccharide from brown algae is a potent modulator of connective tissue proteolysis // Arch. Biochem. Biophys. 2006. Vol. 445, N 1. P. 56–64.

Serkedjieva J. Antiviral activity of the red marine alga *Ceramium rubrum* // *Phytother. Res.* 2004. Vol. 18, N 6. P. 480–483.

Shi Z.Y., Guo Y.Z., Wang Z. Pharmacological activity of fucoidan from *Laminaria japonica* // *J. Shanghai Fish Univ.* 2000. Vol. 9. P. 268–271.

Shibata H., Imuro M., Uchiya N. Preventive effect of Cladosiphon fucoidan against *Helicobacter pylori* infection in Mongolian // *Helicobacter.* 2003. Vol. 8, N 1. P. 59–65.

Shibata H., Kimura-Tagaki L., Nagaoka M. et al. Properties of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* tokida in gastric mucosal protection // *Biofactors.* 2000. Vol. 11, N 4. P. 235–245.

Shimaoka M., Ikeda M., Iida M. et al. Fucoidin, a potent inhibitor of leucocyte rolling prevents neutrophil influx into phorbol-ester- induced inflammatory sites in rabbit lung // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996. Vol. 153, N 1. P. 307.

Shimoi K., Masuda S., Furugori M. et al. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in gamma-ray irradiated mice // *Carcinogenesis.* 1994. Vol. 15, N 11. P. 2669–2672.

Shimoi K., Masuda S., Shen B., et al. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice // *Mutat. Res.* 1996. Vol. 350, N 1. P. 153–161.

Shin H.C., Hwang H.J., Lee B.H. An antioxidative and antiinflammatory agent for potential treatment of osteoporosis from *Ecklonia cava* // *Arch. Pharm. Res.* 2006. Vol. 29, N 2. P. 165–171.

Shurin M.R., Lu L., Kalinski P. et al. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy // *Semin. Immunopathol.* 1999. Vol. 21, N 3. P. 339–344.

Silchenko A.S., Kusaykin M.I., Kurilenko V.V. et al. Hydrolysis of fucoidan by fucoidanase isolated from the marine bacterium, *Formosa algae* // *Mar. Drugs.* 2013. Vol. 11, N 7. P.2413-2430.

Silva T.M.A., Alves L.G., de Queiroz K.C.S. et al. Partial characterization and anticoagulant activity of heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora* // *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2005. Vol. 38, N 4. P. 523–533.

Singh A.P., Chaudhary B.R. Preliminary phitochemical analysis and in vitro antibacterial screening of *Phithophora oedogonia* (Mont.) Wittrock-A freshwater green alga forming mats in the water bodies // *J. Algal Biomass Util.* 2010. Vol. 1, N 2. P.33–41.

Singh S., Aggarwal B.B. Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270, N 42. P. 24995–25000.

Sinha S., Astani A., Ghosh T. et al. Polysaccharides from *Sargassum tenerimum*: structural features chemical modification and anti-viral activity // *Phytochemistry.* 2010. Vol. 71, N 2-3. P. 235–242.

Siqueira R.C.L., daSilva M.S.J., de Alencar D.B. et al. In vivo anti-inflammatory effect of a sulfated polysaccharide isolated from the marine

brown algae *Lobophora variegata* // *Pharm. Biol.* 2011. V. 49, N 2. P. 167–174.

Skriptsova A.V., Shevchenko N.M., Tarbeeva D.V. et al. Comparative study of polysaccharides from reproductive and sterile tissue of five brown seaweeds // *Mar. Biotechnol.* 2012. Vol. 14, N 3. P. 304–311.

Skriptsova A.V., Khomenko V.V., Isakov V.V. Seasonal changes in growth rate, morphology and alginate content in *Undaria pinnatifida* at the northern limit in the Sea of Japan (Russia) // *J. Appl. Phycol.* 2004. Vol. 16, N 1. P. 17–21.

Skriptsova A.V., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N. et al. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (*Laminariales, Phaeophyta*) // *J. Appl. Phycol.* 2010. Vol. 22, N 1. P. 79–86.

Sogawa K., Matsuda M., Okutani K. Induction of apoptosis by a marine microalgal polysaccharide in a human leukemic cell line // *J. Mar. Biotechnol.* 1998. Vol. 6, N 4. P. 241–243.

Spavieri J., Kaiser M., Casey R. et al. Antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic potential of some British green algae // *Phytotherapy Res.* 2009. Vol. 24, N 7. P. 1095–1098.

Spengler B., Cotter R.J. Ultraviolet-Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry of Proteins above 100000 Daltons by Pulsed Ion Extraction Time-of-Flight Analysis // *Anal. Chem.* 1990. Vol. 62, N 8. P. 793–796.

Spengler B., Kirch D., Kaufmann R. et al. Structure analysis of branched oligosaccharides using post-source decay in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry // *Org. Mass Spectrom.* 1994. Vol. 29, N 12. P. 782–787.

Speransky V.V., Brawley S.H., MacCully M.C. Ion fluxes and modification of the extracellular matrix during gamete release // *J. Phycol.* 2001. Vol. 37, N 4. P. 555–573.

Speransky V.V., Speransky S.R., Brawley S.H. Cryptoanalytical studies of freezing damage and recovery in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) // *J. Phycol.* 1999. Vol. 35. P. 1264–1275.

Springer G.F., Wurzel H.A., McNeal G.M.J. Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidan // *Proc. Soc. Biol. Med.* 1957. Vol. 94, N 2. P. 404–409.

Stiles J., Guptill-Yoran L., Moore G.E., Pogradichniy R. Effects of lambda-carrageenan on in vitro replication of feline herpesvirus and on experimentally induced herpetic conjunctivitis in cats // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008. Vol. 49, N 4. P. 1496–1501.

Stoian I., Oros A., Moldoveanu E. Apoptosis and free radicals // *Biochem. Mol. Med.* 1996. Vol. 5, N 2. P. 93–97.

Stortz C.A., & Cerezo A.S. Room-Temperature, Low-Field C-13-Nmr Spectra of Degraded Kappa-Iota-Carrageenans // *Int. J. Biol. Macromol.* 1991. Vol.13, N 2. P. 101–104.

Stortz C.A., & Cerezo A.S. Specific Fragmentation of Carrageenans // Carbohydr. Res. 1987. Vol. 166, N 2. P. 317–323.

Sulaiman M., Kurup G.M., Rauf A.A. Antiinflammatory and antioxidant effect of sulphated polysaccharide isolated from marine algae *Padina tetrastromatica* from Kerala coast // J. Pharm. Res. 2011. Vol. 4, N 3. P. 784–788.

Sun J., Feng A., Zhang Y. et al. Fucoidan increases TNF α - induced MMP-9 secretion in monocytic cell line U937 // Inflamm. Res. 2010. Vol. 59, N 4. P. 271–276.

Sun L., Zhu B., Li D. et al. Purification and bioactivity of a sulfated polysaccharide conjugate from viscera of abalone *Haliotis discus hannai* Ino // Food Agr. Immunol. 2010. Vol. 21, N 1. P. 15–26.

Sun J., Feng A., Zhang Y. et al. Fucoidan increases TNF α -induced MMP-9 secretion in monocytic cells // Inflammation Res. 2010. Vol. 59, N 4. P. 271–276.

Sun J., Feng A., Zhang Y. et al. Fucoidan increases TNF α -induced MMP-9 secretion in monocytic cells // Inflammation Res. 2010. Vol. 59, N 4. P. 271–276.

Susín S., Daugas E., Ravagnan L., et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis // J. Exp. Med. 2000. Vol. 192, N. 4. P. 571–579.

Suzuki Y., Kuma K., Matsunaga K. Iron requirement of the brown macroalgae *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida* (*Phaeophyta*) and the crustose coralline alga *Lithophyllum yessoense* (*Rhodophyta*), and their competition in the northern Japan Sea // Phycologia. 1995. Vol. 34, N 3. P. 201–205.

Sweeney E.A., Priestley G.V., Nakamoto B. et al. Mobilization of stem/progenitor cells by sulfated polysaccharides does not require selectin presence // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97, N 12. P. 6544–6549.

Sweeney T., Dillon S., Fanning J. et al. Evaluation of seaweed-derived polysaccharides on induces of gastrointestinal fermentation and selected populations of microbiota in newly weaned pigs challenged with *Salmonella typhimurium* // Animal. 2011. Vol. 16, N 1. P. 85.

Sztejn M.B., Serrate S.A. Characterization of the immunoregulatory properties of thymosin- α 1 on interleukin-2 production and interleukin-2 receptor expression in normal human lymphocytes // Int. J. Immunopharmacol. 1989. Vol. 11, N 7. P. 789–800.

Tabarsa M., Han J.H., Kim C.Y., You S.G. Molecular characteristics and immunomodulatory activities of water-soluble sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* // J. Med. Food. 2012. Vol. 15, N 2. P. 135–144.

Tak P.P., Firestein G.S. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases // J. Clin. Invest. 2001. Vol. 107, N 1. P. 7–11.

Takabatake N., Hashiba S., Borck S. et al. Fucoidan inhibit the *in vitro* growth of *Babesia bovis* // Protozool. Res. 2004. Vol. 14, N 3–4. P. 55–60.

Takahashi M., Suzuki T., Seino H. Mori H. Antitumor effect of seaweeds. IV. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from

Sargassum kjellmanianum // Jpn. J. Exp. Med. 1984. Vol. 54, N 4. P. 143–151.

Takeda K. Toll-like receptors and their adaptors in innate Immunity. // Curr. Med. Chem. 2005. Vol. 4, N 1. P. 3–11.

Takeda K., Akira S. Toll-like receptors in innate immunity // Int. Immunol. 2005b. Vol. 17, N 1. P. 1–14.

Takeda K., Smyth M.J., Cretney E. et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis – inducing ligand in immune surveillance against tumor development // J. Exp. Med. 2002. Vol. 195, N. 2. P. 161–169.

Talarico L.B., Pujol C.A., Zibetti R.G. et al. The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is and host cell // Antiviral Res. 2005. Vol. 66, N 2–3. P. 103–109.

Talarico L.B., Zibetti R.G., Faria P.C. et al. Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia erenulata* // Int. J. Biol. Macromol. 2004. Vol. 34, N 1-2. P. 63–71.

Talrose V.L., Person M.D., Whittall R.M. et al. Insight into absorption of radiation/energy transfer in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization: the roles of matrices, water and metal substrates // Rapid Commun. Mass Spectrom. 1999. Vol. 13, N 21. P. 2191–2198.

Talysinski M.M., Souprun Y.Y., Huleihel M.M. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against retroviruses // Cancer Cell Int. 2002. Vol. 2, N 1. P. 8–12.

Tanoue T., Nishitani Y., Kanazawa K. et al. In vitro model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. Vol. 374, N 3. P. 565–569.

Taskin E., Ozturk M., Taskin E., Kurt O. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey) // Afr. J. Biotechnol. 2007. Vol. 6, N 24. P. 2746–2751.

Taylor G.I. Disintegration of Water Drops in an Electric Field // Proc. R. Soc. Lond. 1964. Vol. 280, N 1382. P. 383–397.

Taylor P.R., Brown G.D., Reid D.M. et al. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages // J. Immunol. 2002. Vol. 169, N 7. P. 3876–3882.

Teas J. The dietary intake of Laminaria, a brown seaweed, and breast cancer prevention // Nutr. Cancer. 1983. Vol. 4, N 3. P. 217–222.

Teixeira M.M., Hellewell P. The effect of the selectin binding polysaccharide // Brit. J. Pharmacol. 1997. Vol. 120, N 6. P. 1059.

Teruya T., Takeda S., Tamaki Y., Tako M. Fucoidan isolated from *Laminaria angustata* var. *longissima* induced macrophage activation // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2010. Vol. 74, N 9. P. 1960–1962.

Teruya T., Takeda S., Yamashiro Y. et al. Anti-cancer cell activities of fucoidan

from *Cladosiphon okamuranus* // 13th European Carbohydrate Symposium: abstr. Bratislava, 2005. P. 133.

Thanassi N.M., Nakada H.I. Enzymatic degradation of fucoidan by enzymes from the hepatopancreas of abalone *Haliotis species* // Arch. Biochem. Biophys. 1967. Vol. 118, N 1. P. 172–177.

Tissot B., Daniel R. Biological Properties of sulfated fucans: the potent inhibiting activity of algal fucoidan against the human complement system // Glycobiology. 2003. Vol. 13, N 12. P. 29G–30G.

Tissot B., Montdargent B., Chevolut L. et al. Interaction of fucoidan with the proteins of the complement classical pathway // Biochem. Biophys. Acta. 2003. Vol. 1651, N 1–2. P. 5.

Tissot B., Salpin J.Y., Martinez M. et al. Differentiation of the fucoidan sulfated L-fucose isomers constituents by CE-ESIMS and molecular modeling // Carbohydr. Res. 2006. Vol. 341, N 5. P. 598–609.

Trento F., Cattaneo F., Pescador R. Antitrombin activity of an algal polysaccharide // Tromb. Res. 2001. Vol. 102, N 5. P. 457–465.

Trincherio J., Ponce N.M.A., Cordosa O.L. et al. Antiretroviral activity of fucoidans extracted from the brown seaweed *Adenocystis utricularis* // Phytotherapy Res. 2009. Vol. 23, N 5. P. 707–712.

Tse K., Horner A.A. Update on toll-like receptor-directed therapies for human disease // Ann. Rheum. Dis. 2007. Vol. 66, Suppl. 3. P. 77–80.

Tsukada H., Nishiyama S., Fukumoto D. et al. Effect of acute acetylcholinesterase inhibition on the cerebral cholinergic nervous system and cognitive function. Functional imaging of the conscious monkey brain using animal PET in combination with microdialysis // Synapse. 2004. Vol. 52, N 1. P. 1–10.

Unger F.M. The chemistry of oligosaccharide ligands of selectins: Significance for the development of new immunomodulatory medicines // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 2001. Vol. 57. P. 207–435.

Usui T., Asari K., Mizuno T. Isolation highly purified “fucoidan” from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities // Agric. Biol. Chem. 1980. Vol. 44, N 8. P. 1965–1966.

Varki A. Selectin ligands // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91, N 16. P. 7390.

Vasselon T., Detmers P.A. Toll receptors: a central element in innate immune responses // Infect. Immun. 2002. Vol. 70, N 3. P. 1033–1041.

Vermeiren G.L., Claeys M.J., Van Bockstaele D. et al. Reperfusion in juru after focal myocardial ischaemia: polymorphonuclear leucocyte activation and its clinical implications // Resuscitation. 2000. Vol. 45, N 1. P. 35–61.

Vetvicka V., Yvin J.C. Effects of marine β -1,3-glucan on immune reaction // Int. Immunopharmacol. 2004. Vol. 4, N 6. P. 721–730.

Vilela-Silva A.C.E.S., Castro M.O., Valente A.P., et al. Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, N 1. P. 379–387.

Vischer P., Buddecke E. Different action of heparin and fucoidan on arterial smooth muscle cell proliferation and thrombospondin and fibronectin metabolism // Eur. J. Cell. Biol. 1991. Vol. 56, N 2. P. 407–414.

Vives R.R., Imberty A., Sattenau Q.J., Lortat-Jakob H.J. Heparan sulfate targets the HIV-1 envelope glycoprotein gp120 coreceptor binding site // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280, N 22. P. 21353–21357.

Vo T.S., Kim S.K. Potential anti-HIV agents from marine resources: an overview // Mar. Drugs. 2010, N 8. P. 2871–2892.

Wahl A.F., Wallace P.M. Oncostatin M in the anti-inflammatory response // Ann. Rheum. Dis. 2001. Vol. 60, N 3. P. 75–80.

Wang H., Ooi E.V., Ang P.O. Antiviral extracts from Hong Kong seaweeds // J. Zhejiang Univ. Sci. B. 2008. Vol. 9, N 12. P. 969–976.

Wang J., Liu L., Zhang Q. et al. Synthesized oversulfated, acetylated and benzoylated derivatives of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* and their potential antioxidant activity in vitro // Food Chem. 2009. Vol. 114, N 4. P. 1285–1290.

Wang J., Zhang Q., Zhang Z. et al. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica* // Int. J. Biol. Macromol. 2010. Vol. 46, N 1. P. 6–12.

Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Li Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica* // Int. J. Biol. Macromol. 2008. Vol. 42, N 2. P. 127–132.

Wang Y., Han F., Hu B. In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate // Nutr. Res. 2006. Vol. 26, N 11. P. 597.

Ward C.J. Pathogen sensing in innate immunity // Expert Rev. Vaccines. 2010. Vol. 9, N 1. P. 19–21.

Waterman P.G., Mole S. Analysis of phenol plants metabolites. Oxford: Blackwell Sci., 1994. 238 p.

Whyte, J.N.C., Southcott, B.A. An extraction procedure for plants: extracts from the red alga *Rhodospira larix* // Phytochemistry. 1970. Vol. 9, N 5. P. 1159–1161.

Wilkinson D. Drugs for treatment of Alzheimer’s disease // Int. J. Clin. Pract. 2001, N 2. P. 129–134.

Witrouw M., De Clercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs // Gen. Pharmacol. 1997. Vol. 29, N 4. P. 497–511.

WO 9747208 (A1), MПК A21D2/18, A23C9/152. Food or drinks / Umeda

Y., Kihara H. et al.; assignee: Takara Shuzo Co [JP]. — publ. 18.12.1997.

Wu X.Z., Chen D. Effects of sulfated polysaccharides on tumor biology // West Indian Med. J. 2006. Vol. 55, N 4. P. 270—273.

Xue C.H., Fang Y., Lin H. et al. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* // J. Appl. Phycol. 2001. Vol. 13, N 1. P. 67—70.

Yamamoto I., Takahashi M., Suzuki T. et al. Antitumor effect of seaweeds. IV. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from *Sargassum kjellmanianum* // Jpn. J. Exp. Med. 1984. Vol. 54, N 4. P. 143—151.

Yamamoto I., Takahashi M., Suzuki T. et al. Antitumor effect of seaweeds. IV. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from *Sargassum kjellmanianum* // Jpn. J. Exp. Med. 1984. Vol. 54, N 4. P. 143—151.

Yamamoto I., Takahashi M., Tamura H. et al. Antitumor activity of edible brown marine algae: effect of crude fucoidan fractions prepared from edible brown seaweeds against L-1210 leukemia // Hydrobiologia. 1984. Vol. 11, N 1. P. 145—151.

Yamamoto Y., Gainor R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer // J. Clin. Invest. 2001. Vol. 107, N 2. P. 135—142.

Yamasaki-Miyamoto Y., Yamasaki M., Tachibana H., Yamada K. Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells // J. Agric. Food. Chem. 2009. Vol. 57, N 18. P. 8677—8682.

Yamashita M., Fenn J.B. Negative-Ion Production with the Electrospray Ion-Source // J. Phys. Chem. 1984. Vol. 88, N 20. P. 4671—4675.

Yan F., Polk D. V. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 277, N 52. P. 50959—50965.

Yanase Y., Hiragun T., Uchida K. et al. Peritoneal injection of fucoidan suppresses the increase of plasma IgE induce OVA-sensitization // Biochem. Biophys. Res. Co. 2009. Vol. 387, N 3. P. 435.

Yang B., Zhao., Yu G. et al. Structural characterization and bioactivities of hybrid carrageenan-like sulfated galactan from red alga *Furcellaria lumbricalis* // Food Chem. 2011. Vol. 124, N 1. P. 50—57.

Yang C., Chung D., Shin I.S. et al. Effect of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* // Int. J. Biol. Macromol. 2008. Vol. 43, N 5. P. 433—437.

Yang J.W., Yoon S.Y., Oh S.J. et al. Bifunctional effects of fucoidan on the expression of inducible nitric oxide synthase // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. Vol. 346, N 1. P. 345.

Yang Y.J., Nam S.J., Kong G. et al. A case-control study on seaweed consumption and the risk of breast cancer // Brit. J. Nutr. 2010. Vol. 103, N 1. P. 1345—1353.

Yasuda M., Takeuchi K., Hiruma M. et al. The complement system in ischemic heart disease // Circulation. 1990. Vol. 81, N 1. P. 156—163.

Ye J., Li Y., Teruya K. et al. Enzyme-digested fucoidan extracts derived from seaweed Mozuku of *Cladosiphon novae-caledoniae* kylin inhibit invasion and angiogenesis of tumor cells // Cytotechnology. 2005. Vol. 47, N 1—3. P. 117—126.

Yermak I.M., Barabanova A.O., Glazunov V.P. et al. Carrageenans from cystocarpic and sterile plants of *Chondrus pinnulatus* (Gigartinaceae, Rhodophyta) collected from the Russian Pacific coast // J. Appl. Phycol. 2006. Vol. 18, N 3-5. P. 361—368.

Yertog M.G.I., Feskens E.J.M., Hollman P.C.Y. et al. Dietary antioxidant flavanoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen elderly study // Lancet. 1993. Vol. 342, N 8878. P. 1007—1011.

Yim J.H., Kim S.J., Ahn S.H. et al. Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 // Mar. Biotechnol. 2004. Vol. 6, N 1. P. 17—25.

Yim J.H., Son E., Pyo S., Lee H.K. Novel sulfated polysaccharide derived from red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity in vivo // Mar. Biotechnol. 2005. Vol. 7, N 4. P. 331—338.

Ying P., Shakibaei M., Patankar M. S. et al. The malaria circumsporozoite protein; interaction of the conserved regions I and II-plus with heparin-like oligosaccharides in heparan sulfate // Exp. Parasitol. 1997. Vol. 85, N 2. P.168—182.

Yoon S.J., Pyun Y.R., Hwang J.K. et al. A sulfated fucan from the brown alga *Laminaria cichorioides* has mainly heparin cofactor II-dependent anticoagulant activity // Carbohydr. Res. 2007. Vol. 342, N 15. P. 2326—2330.

Yoon W.J., Ham Y.M., Kim K.N. et al. Anti-inflammatory activity of brown alga *Dictyota dichotoma* in murine macrophage RAW264.7 cells // J. Med. Plant. Res. 2009. Vol. 3, N 1. P. 1—8.

Yu G., Zhao X., Yang B. et al. Sequence determination of sulfated carrageenan-derived oligosaccharides by high-sensitivity negative-ion electrospray tandem mass spectrometry // Anal. Chem. 2006. Vol. 78, N 24. P. 8499—8505.

Zacharopoulos V.R., Phillips D.M. Vaginal formulations of carrageenan protect mice from *Herpes simplex* virus infection // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1997. Vol. 4, N 4. P. 465—468.

Zaia J. Mass spectrometry of oligosaccharides // Mass Spectrom. Revs. 2004. Vol. 23, N. 3. P. 161—227.

Zaki S.R., Greer P.W., Coffield L.M. et al. Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of emerging infectious disease // Amer. J. Pathol. 1995. Vol. 146, N 3. P. 552—579.

Zandi K., Fouladvand M., Pakdel P., Sartavi K. Evaluation of *in vitro* antiviral activity of a brown alga (*Cystoseira myrica*) from the Persian Gulf against *Herpes*

simplex virus type I // Afr. J. Biotechnol. 2007. Vol. 6, N 22. P. 2511–2514.

Zaretsky F.R., Pearce-Pratt R., Phillips D.M. Sulfated polyanions block Chlamidia trachomatis infection of cervix-derived human epithelia // Infect. Immunol. 1995. Vol. 63, N 9. P. 3520–3525.

Zarkadis I.K., Mastellos D., Lambris J.D. Phylogenetic aspects of the complement system // Dev. Comp. Immunol. 2001. Vol. 25, N. 8-9. P. 745–762.

Zen K., Liu Y., Cairo Y.D., Parkos C.A. CD11b/CD18-dependent interactions of neutrophils with intestinal epithelium are mediated by fucosylated proteoglycans // J. Immunol. 2002. Vol. 169, N 9. P. 5270.

Zhang C., Kim S.K. Matrix metalloproteinase inhibitors from marine natural products: the current situation and future prospects // Mar. Drugs. 2009. Vol. 7, N 2. P. 71–84.

Zhang H.J., Mao W.J., Fang F. et al. Chemical characteristics and anticoagulant activities of a sulfated polysaccharide and its fragments from *Monostroma latissimum* // Carbohydr. Polym. 2007. Vol. 71, N. 3. P. 428–434.

Zhang K., Das N.P. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferase // Biochem. Pharmacol. 1994. Vol. 47, N 11. P. 2063–2068.

Zhang Q., Li Z., Zhou G. et al. Immunosuppressive activities of fucoidan from *Laminaria japonica* // Chin. J. Oceanol. Limn. 2003. Vol. 21, N. 4. P.324–328.

Zhang Q., Yu P., Li Z. et al. Antioxidant activities of sulfated fractions from *Porphira haitensis* // J. Appl. Physiol. 2003. Vol. 15, N 4. 45. P. 301–310.

Zhang X.W., Liu Q., Thorlacius H. Inhibition of selectin function and leukocyte rolling protects against dextran sodium sulfate – induced murine colitis // Scand. J. Gastroenterol. 2001. Vol. 36, N 3. P. 270–275.

Zhang Z.Q., Yu G.L., Zhao X. et al. Sequence analysis of alginate-derived oligosaccharides by negative-ion electrospray tandem mass spectrometry // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2006. Vol. 17, N 4. P. 621–630.

Zhang Z., Teruya K., Eto H. et al. Fucoidan extract induces apoptosis in MCF-7 cells via a mechanism involving the ROS-dependent JNK activation and mitochondria-mediated pathways // PloS One. 2011. Vol. 6, N 6. P. e27441–27454.

Zhang Z., Wang X., Liu X. et al. Extration of polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro // Carbohydr. Polym. 2010. Vol. 82, N 1. P. 118–121.

Zhao X., Chang-Hu X., Ba-Fung U. Study of antioxidant activity of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* // J. Appl. Algol. 2008. Vol. 20, N 4. P. 431–436.

Zhao X., Xue C., Cai Y., Wang D., Fang Y. Study of antioxidant activities of fucoidan from *Laminaria japonica* // Hight. Tech. Lett. 2005. Vol. 11, N 1. P. 91–94.

Zhivotovsky B., Orrenius S. Clinical perspectives of cell death: where we are

and where to go... // Apoptosis. 2009. Vol. 14, N 4. P. 333–335.

Zhu W., Ooi V. E., Chan P. K. et al. Isolation and characterization of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* and determination of its anti-herpes activity // Biochem. Cell. Biol. 2003. Vol. 81, N 1. P. 25–33.

Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion // Nat. Rev. Immunol. 2006. Vol. 6, N 10. P. 715–727.

Zoratti M., Szabo I. The mitochondrial permeability transition // Biochim. Biophys. Acta. 1995. Vol. 1241, N 2. P. 139–176.

Zouhaier B.A., Rafik B.S., Farhat F. Antiinflammatory, antioxidant and antimicrobial activities of aqueous and organic extracts from *Dictiopteris membranaceae* // Bot. Mar. 2010. Vol. 53, N 3. P. 259–264.

Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Nazarova I.V. et al. Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. // Comp. Biochem. Phys. C. 2000. Vol. 126, N 3. P. 209–215.

Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. et al. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the on the developmental conditions // J. Exp. Marine Biol. Ecol. 2003. Vol. 294, N 1. P. 1–13.

Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L. et al. Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian Far-East. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans // J. Exp. Marine Biol. Ecol. 2005. Vol. 320, N 2. P. 123–131.

Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich I.B. et al. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds // Carbohydr. Res. 1999. Vol. 322, N 1–2. P. 32–39.

Абелев Г.И. Взаимодействие врожденного и приобретенного иммунитета в защите организма от инфекции // Соров. образоват. журн. 1998. №. 2. С. 53–58.

Абрамова Ж.И., Оксенгендлер Г.И. Человек и противоокислительные вещества. Л.: Наука, 1985. 230 с.

Александров М.Л., Безукладников П.В., Грачев М. А. et al. Применение масс-спектрометрии ЭРИАД для исследования реакционных смесей, содержащих олигосахариды // Биоорганич. химия. 1986. Т.12, №. 12. P. 1689–1692.

Алексеев Т.В., Жанаева С.Я., Венедиктова А.А. и др. Противоопухолевая и антиметастатическая активность сульфатированного полисахарида фукоидана, выделенного из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2007. Т. 143, №. 6. С. 675–677.

Аминина Н.М., Вишневская Т.И., Гурулева О.Н., Ковекодова Л.Т. Состав и возможности использования бурых водорослей дальневосточных морей // Вестник ДВО РАН. 2007. Вып. 6. С. 123—130.

Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Байракова А.Л. и др. Молекулярные механизмы индукции врожденного иммунитета // Вестник РАМН. 2009. №. 4. С. 42—48.

Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П. Структура и биологические эффекты эндотоксинов грамотрицательных бактерий // Эпидемиология и инфекц. болезни. 2008. №. 5. С.61—64.

Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет противоопухолевый и противои инфекционный. М.: Практик. медицина. 2008. 255 с.

Ашрафян Л.А., Киселев В.И. Опухоли репродуктивных органов (этиология и патогенез) [Электронный ресурс] М. : Димитрейд График Групп, 2007. Режим доступа: <http://ilmixgroup.ru/assets/images/specam/monografi/oruxoli.pdf>

Бабаченко П.В., Кузьмина А.И., Тимченко В.Н. и др. Роль катионных белков нейтрофилов в патогенезе коклюша // Журн. микробиологии. 1993. №. 6. С. 107—109.

Бабаян М.Л. Влияние полисахаридов на внутрикишечный метаболизм: физиологические аспекты и возможности клинического применения // Лечащий врач. 2011. №6. С. 36—42.

Бакуев М.М., Саидов М.З., Бутаков А.А. Особенности секрети миелопероксидазы и хемилюминесцентного ответа нейтрофилов человека при контакте со стимуляторами различной природы // Иммунология. 1991. №1. С. 15—17.

Бакунина И.Ю., Шевченко Л.С., Недашковская О.И. и др. Поиск фукоидан-гидролаз среди морских микроорганизмов // Микробиология. 2000. Т. 69. № 3. С. 370—376

Бакунина И.Ю., Недашковская О.И., Алексеева С.А. и др. Особенности деградации фукоидана морскими протеобактериями *Pseudoalteromonas citrea* // Микробиология. 2002. Т. 71, № 1. С. 49—55.

Балконская Л.А., Шпакова Т.А. Смена растительных сообществ у юго-западного Сахалина (г. Невельск-пос. Садовники) // Прибрежные гидробиологические исследования : сб. науч. тр. М. : Изд-во ВНИРО, 1999. с. 71—74.

Барабанова А.О., Ермак И.М., Реунов А.В. и др. Взаимосвязь между структурой и антивирусной активностью каррагинанов // Морские прибрежные экосистемы: водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки : материалы Второй междунар. науч.-практ. конф., Архангельск, 5–7 окт. 2005 г. М.: Изд-во ВНИРО, 2005. С. 252—254.

Барабанова А.О., Ермак И.М., Глазунов В.П. и др. Сравнительное из-

учение каррагинанов из репродуктивной и стерильной форм *Tichocarpus crinitus* (Gmel.) Rupr. (Rhodophyta, Tichocarpaceae) // Биохимия. 2005. Т. 70, Вып. 3. С. 430—437.

Барашков Г.К. Сравнительная биохимия водорослей. М.: Пищ. промышленность, 1972. 355 с.

Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2001. 296 с.

Барышников А.Ю., Степанова Е.В. Проблемы лекарственной резистентности // Материалы III ежегодной российской онкологической конференции. Спб., 1999. С. 38.

Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М. : Эдиториал УРСС, 2002. 320 с.

Безукладников П.В., Елякова Л.А., Звягинцева Т.Н. и др. Изучение реакций, катализируемых карбогидразами, с помощью масс-спектрометрии ЭРИАД //Химия природн. соединений. 1989. №. 1. Р. 54—59.

Белокриницкая Т.Е. Роль цитокинов в патогенезе нарушений иммунитета и гемостаза у больных с тяжелыми дисплазиями и раком шейки.

Белякова Г.А., Дьяков Ю.Т., Тарасов К.Л. Ботаника: в 4 т. Т. 2. Водоросли и грибы. М.: Изд. центр «Академия». 2006. 320 с.

Библь Р. Цитологические основы экологии растений. М.: Пищевая промышленность. 1972. 355 с.

Билан М.И., Захарова А.Н., Грачев А.А. и др. Полисахариды водорослей. 60. Фукоидан из тихоокеанской бурой водоросли *Anialipus japonicus* (Harv.) Winne (Ectocarpales, Scytosiphonaceae) // Биоорган. химия. 2007. Т. 33, №. 44. С. 38—46.

Билан М.И., Кусайкин М.И., Грачев А.А., Цветкова Е.А., Звягинцева Т.Н., Нифантьев Н.Э., Усов А.И. Действие ферментного препарата из морского моллюска *Littorina kurila* на фукоидан из бурой водоросли *Fucus distichus* // Биохимия. 2005. Т. 70, №. 12. С. 1606—1612.

Бичучер А.М., Козлов Л.В. Исследование действия лекарственных веществ на комплемент. Ингибирование связывания субкомпонента C1q с мишенью // Экспер. клин. фармакология. 2007. Т. 70, №. 6. С. 25—28.

Блинова Е.И. Основные водоросли северо-восточной части Охотского моря (распределение, экология, фитомасса) // Раст. ресурсы. 1971. Т.7, № 2. С. 252—259.

Блинова Е.И. Подводные исследования водорослевого пояса северо-восточной части Охотского моря // Морские подводные исследования: сб. ст. М.: Наука, 1969. С. 114—120.

Бовин Н.В., Усов А.И., Ушакова Н.А. Сульфатированные полисахариды как ингибиторы рецепторной активности Р-селектина и

P-селектинзависимого воспаления // Вопр. мед. химии. 1998. №. 2. С. 135.

Богомаз Т.А. Механизмы регуляции системы комплемента человека некоторыми природными факторами.: дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2006. 119 с.

Бунин Ю.А. Применение низкомолекулярных гепаринов в лечении и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний // Трудный пациент. 2006. Т. 4, №. 1. С. 17—21.

Бурлакова Е.Б. Роль липидов в процессе передачи информации в клетке // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ. М.: Наука, 1981. С. 23—34.

Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты // Успехи химии. 1985. Т. 54, № 9. С. 1540—1558.

Варивода А.С. Рецепторы врожденного иммунитета: ассоциированные с Toll-подобными рецепторами функции клеток иммунной системы в норме и при первичных иммунодефицитах. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. / Рос. гос. мед. ун-т. М., 2008. 18 с.

Васильев С.А., Воробьев А.И., Городецкий В.М. Терапия острого синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови // *Materia Medica*. 1997. №. 1. С. 23—36.

Вишук О.С., Ермакова С.П., Тин Ф.Д. и др. Противоопухолевая активность фукоиданов бурых водорослей // Тихоокеан. мед. журн. 2009. № 3. С. 92—96.

Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия // Клин. лаборатор. диагностика. 2002. № 11. С. 25—32.

Возжинская В.Б., Селицкая (Вишнеская) Н.М. Видовой состав, распределение и запасы фукоидов в Охотском море // Труды / Ин-т океанологии АН СССР. М., 1970. Т. 88 : Экология и распределение морской донной фауны и флоры. С. 281—288.

Гилева И.П., Малкова Е.М., Непомнящих Т.С. и др. Изучение действия TNF-связывающего белка вируса натуральной оспы на развитие ЛПС-индуцированного эндотоксического шока // Цитокины и воспаление. 2006. Т. 5, №. 1. С. 44—49.

Гитун Т.В. Инфаркт миокарда. Диагностика, профилактика и методы лечения. М.: Центрполиграф, 2004. 160 с.

Голлербах М.М., Полянский В.И. Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 1. Пресноводные водоросли и их изучение. М.: Сов. наука, 1951. 200 с.

Головачева Т.В., Скворцов В.В., Скворцов К.Ю. Применение антикоагулянтов при сердечно-сосудистых заболеваниях // Атеротромбоз. 2009. №. 2. С. 2—19.

Грибанов Г.А. О метаболических взаимопревращениях липидов // Успехи совр. биологии. 1979. №. 1. С. 16—33.

Гузилова Ю.И., Москалева Е.Ю. TLR4 как мишень для активации

специфического и неспецифического иммунитета // Вопр. биол. мед. фарм. химии. 2009. №. 3. С. 58—64.

Гуревич М.А. Лечение статинами — базисная терапия коронарной болезни сердца // Клин. медицина. 2003. №. 12. С. 60—62.

Деканенко А.Е., Ткаченко Е.А. Хантавирусы и хантавирусные инфекции // Вопр. вирусологии. 2004. № 3 С. 40—44.

Денисова А.В., Крупнова Т.Н. Перспектива культивирования костарии ребристой (*Costaria costata*) в прибрежье Приморья // Тезисы докладов четвертой международной научно-практической конференции "Морские прибрежные экосистемы. Водоросли, беспозвоночные и продукты их переработки». Южно-Сахалинск, 19—22 сентября. 2011. С. 176—177.

Деретик В., Кленски Д. Генеральная уборка // В мире науки. 2008, №.8. С. 44—51.

Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза: Рос. рекомендации. IV пересмотр. [Электронный ресурс]. // Всерос. науч. о-во кардиологов. 2009. Режим доступа: <http://athero.ru/Lipids-rus-2009.pdf>.

Дрозд Н.Н., Толстенков А.С., Мигаль И. и др. Фармакодинамические параметры антикоагулянтов на основе сульфатированных полисахаридов из морских водорослей // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2006. Т. 142, №. 11. С. 537—540.

Душкин М.И. Макрофаги и атеросклероз: патофизиологические и терапевтические аспекты // Бюлл. СО РАМН. 2006. №. 2. С. 47—55.

Ежов М.В., Лякишев А.А., Покровский С.Н. Липопротеид(а) независимый фактор риска атеросклероза // Терапевт. архив. 2001. №. 9. С. 76—82.

Ермак И.М. Взаимодействие бактериальных липополисахаридов с белками и полисахаридами. Модификация физиологической активности липополисахаридов: автореф. дис. ... д-ра хим. наук. Владивосток, 2006. 48 с.

Ермак И.М., Барабанова А.О., Кукарских Т.А. и др. Природный полисахарид каррагинан как ингибитор токсического действия эндотоксинов грамотрицательных бактерий // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2006. Т. 141, №. 2. С. 191—193.

Ермак И.М., Давыдова В.Н., Аминин Д.Л. и др. Иммуномодулирующая активность каррагинанов из красных водорослей дальневосточных морей // Тихоокеан. мед. журн. 2009. №. 3. С. 40—44.

Еськов А.П., Каюмов Р.И., Соколов А.Е. Механизм повреждающего действия бактериального эндотоксина // Энтеросорбция как метод предотвращения эндотоксиновой агрессии : сб. ст. М., 2004. С. 19—23.

Железнякова Г.Ф. Инфекция и иммунитет: стратегии обеих сторон // Мед. иммунология. 2006. Т. 8, №. 5—6. С. 597—614.

Жизнь растений. М.: Просвещение. 1977. 487 с.

Жильцов А.С. Гидрологическая роль горных хвойно-широколиственных лесов южного Приморья. Владивосток: Дальнаука. 2008. 332 с.

Зайцев В.Г., Островский О.В., Закревский В.И. Связь между химическим строением и мешенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия // Экспер. клинич. фармакология. 2003. Т. 66, №. 4. С. 66—70.

Запорожец Т.С. Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия биополимеров морских гидробактерий: **дис. ... докт. мед. наук.** / ВГМУ. Владивосток, 2006. 365 с.

Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Иммуноактивные биополимеры из морских гидробактерий. Владивосток: Изд-во ТИНРО-центра, 2007. 219 с.

Звягинцева Т.Н., Сова В.В., Бакунина И.Ю. и др. Морские организмы как источник биологически активных полисахаридов, полисахаридгидролаз с уникальной специфичностью их ингибирования // Химия в интересах устойчивого развития. 1998. №. 6. с. 417—426.

Звягинцева Т.Н., Широкова Н.И., Елякова Л.А. Структуры ламинаринов из некоторых бурых водорослей (Россия) // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20, №. 12. С. 1349—1358.

Зенков Н.К., Меньшикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113, вып. 3. С. 286—296.

Зуев В.А. Прионы — новый класс возбудителей инфекционных заболеваний // Антибиотики и химиотерапия. 1999. №. 10. С. 33—38.

Зуев В.А., Завалишин И.А., Ройхель В.М. Прионные болезни человека и животных. Руководство для врачей. М.: Медицина, 1999. 139 с.

Игонин А.А., Кукес В.Г., Пальцев М.А. Сепсис: молекулярные механизмы системного воспаления в качестве модели для изучения перспективных терапевтических мишеней // Молекуляр. медицина. 2004. №. 2. С. 3—12.

Имбс Т.И., Красовская Н.П., Ермакова С.П. и др. Сравнительное исследование химического состава и противоопухолевой активности водно-этанольных экстрактов бурых водорослей *Laminaria cichorioides*, *Costaria costata* и *Fucus evanescens* // Биология моря. 2009. Т. 35, №. 2. С. 140—146.

Имбс Т.И., Харламенко В.И., Звягинцева Т.Н. Оптимизация процесса экстракции фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* // Химия растит. сырья. 2012. №. 1. С. 143—147.

Имбс Т.И., Шевченко Н.М., Суховерхов С.В. и др. Влияние сезона на состав и структурные характеристики полисахаридов бурой водоросли *Costaria costata* // Химия природн. соединений. 2009. №. 6. С. 661—665.

Камнев А.Н. Структура и функции бурых водорослей. М.: Изд-во

МГУ, 1989. 200 с.

Кения М.В., Лукаш А.И., Гуськов Е.П. Золь низкомолекулярных антиоксидантов при окислительном стрессе // Успехи соврем. биологии. 1993. Т. 113, вып. 4. С. 456—470.

Кизеветтер И.В., Суховеева М.В., Шмелькова Л.П. Промысловые морские водоросли и травы дальневосточных морей. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981. 112 с.

Киселев С.А., Чичерин Д.С., Харитонов Д.В. Пребиотики: новая стратегия лечения дисбактериоза кишечника. Качество жизни. М.: Медицина, 2004. №. 2. 125 с.

Киселева М.И., Шевченко Н.М., Крупнова Т.Н. и др. Влияние фукоиданов на развивающиеся эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 2005. Т.41, №. 1. С. 51—57.

Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. СПб.: Питер Ком, 1999. 512 с.

Клочкова Н.Г., Крупнова Т.Н. Новый вид и род ламинариевых водорослей (*Laminariales, Phaeophyta*) дальневосточных морей России. *Tauya basicrassa* Kloczc. et Krupn. gen. et sp. nov. // Альгология. 2004. Т. 14, №. 1. С. 52—61.

Клочкова Н.Г. Водоросли-макрофиты дальневосточных морей России: **дис. ... д-ра биол. наук.** Владивосток, 1998. 277 с.

Клочкова Н.Г., Березовская В.А. Водоросли Камчатского шельфа. Распространение, биология и химический состав. Петропавловск-Камчатский: Дальнаука, 1997. 155 с.

Клочкова Н.Г., Королева Т.Н. Видовой состав морских водорослей-макрофитов острова Парамушир (Северные Курилы) // Альгология (Киев). 2003. Т. 13, №. 1. С. 83—94.

Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С. Врожденные компоненты иммунитета: Toll-подобные рецепторы в норме и при иммунопатологии // Журн. микробиологии. 2005. Вып. 4. С. 96—104.

Козлов В.К. Дисфункция иммунной системы в патогенезе сепсиса: возможности диагностики // Цитокины и воспаление. 2006. Т. 5, №. 2. С. 15—29.

Козлов Л.В., Бурделев О.О., Буреева С.В., Каплун А.П. Искусственное ингибирование системы комплемента // Биоорганич. химия. 2007. Т.33, №. 5. С. 485—510.

Коннова Ю.А. Патогенетические механизмы интоксикационного синдрома при острых кишечных инфекциях и методы его коррекции: **дис. ... канд. мед. наук.** М, 2007. 153 с.

Коровкина Н.В. Исследование условий заготовки, консервирования бурых водорослей Белого моря и извлечения иодсодержащих веществ:

автореф. дис. ...техн. наук. Архангельск, 2007. 19 с.

Короленко Т.А., Жанаева С.Л., Потеряева О.Н. и др. Регуляция активности цистеиновых протеаз: роль предшественников протеаз (проферментов) и внутриклеточных ингибиторов // Бюлл. СО РАМН. 2004. №. 2. С. 30—38.

Короленко Т.А., Жанаева С.Я., Филатова Т.Г. и др. Изменения тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ 1-го типа и матриксных металлопротеиназ при развитии и метастазировании опухолей // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2010. №. 8. С. 198—201.

Коэн Д. Современные подходы к лечению сепсиса: есть ли новые надежды? // Клинич. микробиол. антимикроб. терапия. 2002. №.4. С. 300—312.

Крупнова Т.Н., Басюк Е.О., Подкорытова А.В. Результаты культивирования *Laminaria japonica* и *Laminaria cichorioides* в Амурском Заливе // Материалы междунар. науч.-практ. конф. «Экологические проблемы использования прибрежных морских акваторий». Владивосток, 2006. с. 117.

Крупнова Т.Н. Адаптационные реакции массовых бурых водорослей прибрежья Японского и Охотского морей в свете разработки биотехнологий их культивирования // Комаровские чтения: сб. науч. тр. Владивосток: Дальнаука, 2005. Вып. 51. С. 124—136.

Крупнова Т.Н. Влияние океанолого-климатических факторов на динамику полей ламинарии японской (*Laminaria japonica* Aresch.) в северо-западной части Японского моря. // Гидрология и гидрохимия морей: монограф. справ. М.: Гидрометеиздат, 2004. Т. VIII. Японское море. Вып. 2. С. 162—166.

Крупнова Т.Н. Водорослевые плантации как элемент оздоровления прибрежных вод // Материалы международной научно-практической конференции «Морская экология-2007(МОРЭК-2007)». Владивосток, 2007. Т.1. С. 199—205.

Крупнова Т.Н. Возобновляемость полей ламинарии японской (*Laminaria japonica* Aresch.) после водолазного промысла // Изв. ТИНРО. 2009. Т. 159. С. 168—175.

Крупнова Т.Н. Инструкция по биотехнологии культивированию ламинарии японской в двухгодичном цикле у берегов Приморья. Владивосток: ТИНРО, 1984. 37 с.

Крупнова Т.Н. Инструкция по культивированию и восстановлению полей ламинарии. Владивосток: ТИНРО, 2008. 34 с.

Крупнова Т.Н. Макрофиты северной части Охотского моря // Тез. докл. II (X) съезда русского бот. о-ва. Спб., 1998. Ч. 2. С. 103—104.

Крупнова Т.Н. Особенности развития спороносовой ткани у ламинарии японской под воздействием изменяющихся условий среды // Изв.

ТИНРО. 2002. Т. 130, Ч. 11. С. 474—482.

Крупнова Т.Н. Павлючков В.А. Пищевые потребности морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* в естественных условиях на ламинариевых полях // Изв. ТИНРО. 2003. Т. 134. С. 195—208.

Крупнова Т.Н., Павлючиков В.А. Питание серого морского ежа (*Strongylocentrotus intermedius*) в прибрежной зоне северо-западной части Японского моря // Изв. ТИНРО. 2000. Т. 127. С. 372—381.

Кузнецова Т.А. Применение фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanesceus* для коррекции иммунитета и гемостаза на модели эндотоксемии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2009. Т. 147, №. 1. С. 71.

Кузнецова Т.А. Коррекция иммунитета и гемостаза биополимерами из морских гидробионтов: дис. ...д-ра мед наук. / НИИВС им. И.И. Мечникова РАМН. М., 2009. 316 с.

Кузнецова Т.А. Коррекция нарушений иммунитета и гемостаза биополимерами из морских гидробионтов (экспериментальные и клинические аспекты): автореф. дис. ...д-ра мед. наук. М., 2009. 50 с.

Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Мамаев А.Н. и др. Антикоагулянтная активность фукоидана из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanesceus* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2003. Т. 136, №. 11. С. 53—39.

Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. и др. Исследование пребиотического потенциала биологически активных веществ из морских гидробионтов и разработка новых продуктов функционального питания // Вестник ДВО РАН. 2011. №. 2. С. 147.

Кузнецова Т.А. Иммуногенные и иммуномодулирующие свойства липополисахарида псевдотуберкулезного микроба: дис. ... канд. мед. наук. Владивосток, 1987. 178 с.

Кузник Б.И., Витковский Ю.А., Сазоненко В.А. и др. Влияние тималина на иммунитет, гемостаз и уровень провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при ожоговой болезни // Гематология и трансфузиология. 2002. Т.47, №. 1. С. 17—21.

Курилович С.А., Кручинина М.В., Генералов В.М. и др. Электрические параметры и структура мембран эритроцитов при диффузных заболеваниях печени // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2009. Т. 19, №. 2. С. 30—36.

Кусайкин М.И., Бурцева Ю.В., Светашева Т.Г., Сова В.В., Звягинцева Т.Н.. Распространение О-гликозилгидролаз в морских беспозвоночных. Ферменты морского моллюска *Littorina kurila*, катализирующие трансформацию фукоиданов // Биохимия. 2003. Т. 68, №. 3. С. 384—392.

Куэрроз К., Ассис К., Медейрос В. и др. Цитотоксический эффект полисахаридов, выделенных из водорослей, на HL60 клетки // Биохимия.

2006. Т. 71, №. 12. С. 1613—1617.

Ланкин В.З., Тихазе А.К., Каминная В.И. и др. Интенсификация *in vivo* свободнорадикального окисления липопротеинов низкой плотности в плазме крови больных ИБС при терапии ингибитором HMG-CoA-редуктазы правастатином и подавление липопероксидации убихиноном Q₁₀ // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2000. Т. 129, №. 2. С. 176—179.

Лапшина Л.А., Реунов А.В., Нагорская В.П. и др. Действие фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* на формирование ВТМ-специфических включений в клетках листьев табака // Физиология растений. 2007, вып. 54. №. 1. С.127—130.

Лебедев К.А. Физиологическая целесообразность функций образующих рецепторов в иммунологии // Физиология человека. 2007. Т. 33, №. 5. С. 133—137.

Липовецкий Б.М. Эпидемиология атеросклероза и артериальной гипертензии. СПб.: Наука, 2004. 191 с.

Липовецкий Б.М., Чураков Г.А. Клиническая оценка сниженного и повышенного уровня липопротеидов высокой плотности в плазме крови // Кардиология. 2001. №. 3. С. 33—35.

Лиходед В.Г., Ющук Н.Д., Яковлев М.Ю. Роль эндотоксина грамотрицательных бактерий в инфекционной и неинфекционной патологии // Архив патологии. 1996. №. 2. С. 8—13.

Лоенко Ю.Н. Биологическая активность и механизм действия биополимеров из морских организмов. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Владивосток. 1999. 62 с.

Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Л. и др. Изоляция штаммов вируса гриппа А/Н5N1 от домашних и диких птиц в Западной Сибири и их депонирование в Государственную коллекцию вирусов // Вопр. вирусологии 2006. №. 1. С.11—14.

Майстровский К.В. Запорожец Т.С. Раповка В.Г. Звягинцева Т.Н. Шевченко Н.М. Коррекция липидного обмена у пациентов с облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей сульфатированным полисахаридом из бурой водоросли *Fucus evanescens* // Тихоокеан. мед. журн. 2010. №. 4. С. 47—50.

Майстровский К.В., Запорожец Т.С., Федянина Л.Н. и др. Влияние иммуномодулятора фукоидана из бурых водорослей *Fucus evanescens* на показатели антиоксидантной системы, липидного и углеводного обмена у мышей // Тихоокеан. мед. журн. 2009. №. 3. С. 103—105.

Майстровский К.В., Раповка Ю.В., Запорожец Т.С. и др. Коррекция липидного и углеводного обмена у больных облитерирующим атеросклерозом сосудов нижних конечностей сульфатированным полисахаридом

из бурой водоросли *Fucus evanescens* // Рос. иммунолог. журн. 2008. Т. 2, №. 2—3. С. 323.

Макаренкова И.Д., Крылова Н.В., Леонова Г.Н. и др. Протективное действие фукоидана из бурой водоросли *Laminaria japonica* при экспериментальном клещевом энцефалите // Тихоокеан. мед. журн. 2009. №. 3. С. 89—92.

Макаренкова И.Д., Ахматова Н.К., Семенова И.Б. и др. Сульфатированные полисахариды из морских бурых водорослей - индукторы созревания дендритных клеток // Тихоокеан. мед. журн. 2009. №. 3. С. 36—39.

Макаренкова И.Д., Дерябин П.Г., Львов Д.К. и др. Противовирусная активность сульфатированного полисахарида из бурой водоросли *Laminaria japonica* в отношении инфекции культур клеток, вызванной вирусом гриппа А птиц (H5N1) // Вопр. вирусологии. 2010. №. 1. С. 41—43.

Макаренкова И.Д., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. и др. Изучение возможности снижения адгезивной активности дифтерийных бактерий биополимерами природного происхождения // Антибиотики и химиотерапия. 1999. №. 3. С. 11—15.

Макаренкова И.Д., Компанец Г.Г., Беседнова Н.Н. и др. Ингибирующее действие фукоиданов на адсорбцию вируса Хантаан на модели перитонеальных макрофагов *in vitro* // Вопр. вирусологии. 2008. Т. 51, №. 3. С.12—15.

Макаренкова И.Д., Логунов Д.Ю., Тухватулин А.И. и др. Взаимодействие сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей с Толл-подобными рецепторами на эукариотических клетках линии НЕК293 *in vitro* // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2012. Т. 154, №. 8. С. 205—208.

Макаров В.А., Горбунова Н.А. Гемостаз и реология крови М.: Триада-фарм, 2003. 104 с.

Максема И.Г., Макаренкова И.Д. Противовирусная активность фукоиданов природного происхождения при экспериментальной инфекции, вызванной вирусом Хантаан // Тихоокеан. мед. журн. 2008. №. 2. С. 86—89.

Маянский А.Н., Маянский Н.А., Заславская М.И. Нуклеарный фактор -кВ и воспаление // Цитокины и воспаление. 2007. Т. 6, №. 2. С. 3—9.

Миркин Б.М., Горская Т.Г. Теоретические аспекты анализа сукцессий в травосмесях // Науч. докл. высш. шк. Биол. науки. 1989. №. 1. С. 7—17.

Назарова И.В. Влияние полисахаридов из морских водорослей и трав на систему комплемента: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Владивосток. 1999. 24 с.

Назарова И.В., Хотимченко Ю.С., Шевченко Н.М. и др. Влияние ионных углеводсодержащих биополимеров на активирование комплемента

// Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2001. Т. 131, № 3. С. 290.

Незговорев Д.В., Корниенко Е.Б., Щеголева Л.С. и др. Иммунокорригирующая терапия фукоиданом при вторичных иммунодефицитах // Мед. иммунология. 2005. Т. 7, № 2—3. С. 150.

Нестерова И.В. Особенности функционирования противовирусного иммунитета // Цитокины и воспаление. 2005. Вып. 4, № 3. С. 89—94.

Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А. Иммуномодулирующие эффекты ликопида при экспериментальной депрессии нейтрофильных гранулоцитов // Иммунология. 1999. № 6. С. 60—61.

Никифорова А.А. Лецитин: холестерин-ацилтрансфераза плазмы крови. // Биохимия липидов и их роль в обмене веществ: материалы пленарных докл. III Всесоюз. симп. «Структура, биосинтез и превращения липидов в организме животного и человека». Л.: Наука, 1978. С. 95—105.

Новгородцева Т.П. Липиды эритроцитов крови при формировании наследуемой кардиальной патологии: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — Владивосток, 2000. 48 с.

Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Янькова В.И. Руководство по методам исследования параметров системы. Перекисное окисление липидов — антиоксидантная защита в биологических жидкостях. Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2003. 80 с.

Облучинская Е.Д. Комплексная технология переработки водорослей рода *Fucus* // Материалы Всерос. семинара «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». Барнаул, 2002. С. 252—254.

Облучинская Е.Д. Совершенствование комплексной технологии лекарственных средств из фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus* L.): автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук / С.-Петербург. гос. хим.-фармацевт. акад. СПб., 2004. 163 с.

Облучинская Е.Д., Воскобойников Г.М., Галынкин В.А. Содержание альгиновой кислоты и фукоидана в фукусовых водорослях Баренцева моря // Прикл. биохимия и микробиология. 2002. Т. 38, № 2. С. 213—216.

Облучинская Е.Д., Минина С.А. Совершенствование способа получения экстракта из фукусовых водорослей // Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38, № 6. С. 36—39.

Оприлова Р.В. Водоохранная роль лесов Южного Сихоте-Алиня. М.: Наука, 1978. 96 с.

Оприлова Р.В. Надземная фитомасса лесов и речной сток в Южном Сихотэ-Алине. Владивосток: ДВО АН СССР, 1991. 117 с.

Парахонский А.П. Регуляция адгезии как способ профилактики инфекционного процесса // Междунар. журн. прикл. фундамент. исслед. 2009, № 5. С. 126—127.

Пат. RU 2132622 C1, МПК А23L1/0532, А61К35/80. Способ переработки бурых водорослей / Некрасова В.Б., Никитина Т.В. и др.; — Оpubл. 10.07.1999, Бюл. № 23.

Пат. RU 2135518 C1, МПК С08В37/00, 37/18, С07Н1/08. Способ получения водорастворимых полисахаридов бурых водорослей / Звягинцева Т.Н., Шевченко Н.М. и др.; — Оpubл. 27.08.1999, Бюл. № 24.

Пат. RU 2194525 C1, МПК А61К35/80, А61К31/734. Способ получения биологически активных веществ из ламинарии для медицинских целей / Компанцев В.А., Кайшева Н.Ш. и др.; — Оpubл. 20.12.2002, Бюл. № 36.

Пат. RU 2233104 C1, МПК А23L1/30, А23L1/337. Способ комплексной переработки бурых водорослей с получением йодосодержащих и полисахаридных продуктов / Аминина Н.М., Вишневская Т.И. и др.; — Оpubл. 27.07.2004, Бюл. № 18.

Пат. RU 2240816 C1, МПК А61К35/80, 31/715. Способ комплексной переработки бурых водорослей с получением препаратов для медицины и косметологии / Шевченко Н.М., Имбс Т.И. и др.; — Оpubл. 27.11.04, Бюл. № 33.

Пат. RU 2302429 C1, МПК С08В37/18, С07Н1/08. Способ получения фукоидана из ламинарии / Врищ Э. А., Ковалев Н. Н. и др.; — Оpubл. 10.07.2007, Бюл. № 19.

Пат. RU 2329864 C1, МПК В01J20/08. Пористый сорбент с гепатопротекторными свойствами / Коненков В.И., Любарский М.С. и др.; — Оpubл. 27.07.2008, Бюл. № 21.

Пат. RU 2337571 C2, МПК А23L1/30. Способ комплексной переработки фукусовых водорослей (варианты) / Облучинская Е.Д.; — Оpubл. 10.11.2008, Бюл. № 31.

Пат. RU 2360545 C1, МПК А23L1/337. Способ переработки бурых водорослей / Герасименко Н.И., Шевченко Н.М. и др.; — Оpubл. 10.07.2009, Бюл. № 19.

Пат. RU 2375878 C1, МПК А23С9/13. Кисломолочный напиток / Каленик Т.К., Федянина Л.Н. и др.; — Оpubл. 20.12.2009, Бюл. № 35.

Пат. RU 2302429 C1, МПК С08В37/18, С07Н1/08. Способ получения фукоидана из ламинарии / Врищ Э.А., Ковалев Н.Н. и др.; — Оpubл. 10.07.2007, Бюл. № 19.

Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Основные свойства дендритных клеток // Иммунология. 2001. № 4. С. 7—16.

Пашенков М.В., Пинегин Б.В. Физиология клеток врожденной иммунной системы: дендритные клетки // Иммунология. 2006. N. 6. С. 368—378.

Петров Ю.Е. Ламинариевые и фукусовые водоросли в морях СССР // Раст. ресурсы. 1973. Т. 9, вып. 1. С. 123—127.

Пинегин Б.В., Бурая Т.Л., Бутаков А.А. и др. Влияние некоторых им-

муномодуляторов на функциональную активность полиморфноядерных лейкоцитов периферической крови здоровых людей // Журн. микробиологии. 1994. № 3. С. 79—83.

Пискун Р.П., Пентюк А.А., Серкова В.К. и др. Энтеросорбенты в лечении атеросклероза // Эксперим. клин. фармакология. 1998. Т. 61, № 2. С. 69—74.

Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Слонова Р.А. и др. Метаболическая активность макрофагов, с возбудителями геморрагической лихорадки с почечным синдромом // Биохимия. 2005. Т. 70, № 9. С. 1198—1207.

Плехова Н.Г., Сомова Л.М., Слонова Р.А. и др. Механизм взаимодействия макрофагов с возбудителем геморрагической лихорадки с почечным синдромом: ультраструктурные аспекты // Цитология. 2003. Т. 45, № 8. С. 770—779.

Подкорытова А.П. Изучение и освоение водорослевых ресурсов в морях России // Пути решения проблем изучения, освоения и сохранения биоресурсов Мирового океана в свете Морской доктрины Российской Федерации на период до 2020 года. М.: Изд-во ВНИРО, 2002. С. 211—213.

Покровский В.И., Киселев О.И. Молекулярные основы прионных болезней // Вестник РАМН. 1998. № 10. С. 45—55.

Покровский В.И., Киселев О.И., Черкасский Б.Л. Прионы и прионные болезни. М.: Изд-во РАМН, 2004. С. 192—193.

Полякова А.М., Астрина О.С., Бахтина Ю.А., Малеев В.В., Барабанова А.О., Ермак И.М. Возможность коррекции функционального состояния тромбоцитов человека с помощью природных полисахаридов в условиях экспериментальной эндотоксинемии и у больных пищевыми токсикоинфекциями // Инфекц. болезни. 2005. Т. 3, № 1. С. 44—46.

Пономарев В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья. М.: Медицина, 1976. 204 с.

Потехина А.В. Промысловая характеристика зарослей ламинариевых у берегов Шантарских островов // Изв. ТИНРО. 1973. Т. 87. С. 139—144.

Пржеменецкая (Макиенко) В.Ф. *Costaria costata* (Turn.) Saund. (Phaeophyta, Laminariales) в дальневосточных морях. // Комаровские чтения : сб. науч. тр. Владивосток: Дальнаука, 1988. Вып. 35. С. 36—51.

Разина Т.Г., Зуева Е.П., Амосова Е.Н. и др. Влияние фукоидана из морской бурой водоросли *Laminaria japonica* на развитие аденокарциномы Эрлиха и карциномы легких Льюис и эффективность циклофосфана у мышей // Тихоокеан. мед. журн. 2010. № 2. С. 36—39.

Репина О.И. Обоснование и разработка технологии биологически активных веществ из фукусовых водорослей Белого моря : автореф. дис. ... канд. техн. наук. / Сев. фил. Поляр. науч.-исслед. ин-та мор. рыб. хоз-ва и океанографии им. Н. М. Книповича. М., 2004. 24 с.

Репина О.И., Муравьева Е.А. Химический состав промысловых бурых водорослей Белого моря // Тр. ВНИРО: Прикладная биохимия и технология гидробионтов. 2004. Т. 143. С. 93—99.

Розкин М.Я., Левина М.Н., Ефимов В.С., Усов А.И. Антикоагулянтная и стимулирующая липолиз активность полисахаридов из бурых морских водорослей // Фармакол. токсикология. 1991. Т. 54, № 5. С. 40—42.

Розкин М.Я., Левина М.Н., Каменева Н.С., Усов А.И., Ефимов В.С. Изучение механизма антикоагулянтного действия фукоиданов // Фармакол. токсикология. 1989. Т. 52, № 3. С. 48—51.

Романова Л.Ю., Гмыль Л.В., Дживанян В.Б. и др. Изменение антигенной структуры поверхностного гликопротеина Е вируса клещевого энцефалита при его адаптации к клещам и млекопитающим // Вопр. вирусологии. 2006. № 6. С. 31—44.

Руднов В.А. Сепсис: современный взгляд на проблему // Клин. антимикроб. терапия. Т. 2, № 1. 2000. С. 4—10.

Рябиченко Е.В., Бондаренко В.М., Веткова Л.Г. Молекулярные аспекты повреждающего действия бактериальных липополисахаридов // Журн. микробиологии. 2004. № 3. С. 98—105.

Сарочан В.Ф., Вялов А.Д. Промысловые водоросли сублиторали островов Малой Курильской гряды // Промысловые водоросли и их использование : сб. науч. тр. М.: Изд-во ВНИРО, 1981. С. 44—51.

Семенов А.В., Мазуров А.В., Преображенская М.Е. и др. Сульфатированные полисахариды как ингибиторы рецепторной активности Р-селектина и Р-селектинзависимого воспаления // Вопр. мед. химии. 1999. Т. 44, вып. 2. С. 135—143.

Семенов Б.Ф., Зверев В.Н. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов // Журн. микробиологии. 2007. № 4. С. 93—100.

Симбирцев А.С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета // Иммунология. 2005. № 6. С. 368—377.

Смолина Т.П., Черных С.В., Горшкова Р.П., Назаренко Е.Л. Снижение адгезии микроорганизмов на клетках уроэпителия с помощью полисахарида, выделенного из морских протеобактерий *Pseudoalteromonas nigrifaciens* // Журн. микробиологии. 2006. № 3. С. 58—61.

Соколова Е.В. Взаимосвязь структуры и биологической активности каррагинанов красных водорослей Японского моря: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2012. 23 с.

Соколовская А.А. CD95-рецепторно-лигандная система в лекарственно-индуцированном апоптозе: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Москва, 2001. 26 с.

Соловьев В. Д., Баландин И.Г. Клетка и вирус. М.: Медицина, 1973. 265 с.

Соловьева Т.Ф., Красикова И.Н., Ермак И.М. Природные вещества морского происхождения как потенциальные препараты для терапии граммотрицательного сепсиса и эндотоксического шока // Вестник ДВО РАН 2010. №. 5. С.131—137.

Соляник Г.И. Противоопухольевая антиангиогенная терапия: принципы, проблемы, перспективы // Онкология. 2006. Т. 8, № 2. С. 206—208.

Сонина Л.Н. Сравнительная активность полисахаридов при экспериментальном поражении печени: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2007. 24 с.

Состояние рыболовства и аквакультуры, 2010: докл. / Департамент рыболовства и аквакультуры ФАО. Продовольств. с.-х. орг. объедин. наций. Рим, 2010. 225 с.

Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф. Природные олигомерные проантоцианидины – перспективные регуляторы метаболических нарушений // Вестник ДВО РАН. 2006. №. 2. С. 81—90.

Суханов А.В., Кемпбелл П., Ким Солес. Гломерулярные депозиты С4d компонента комплемента при фокальном сегментарном гломерулосклерозе и IgM-нефропатии (результаты исследования по выявлению С4d компонента комплемента в биоптатах почки при различных нефропатиях) // Нефрология и диализ. 2003. Т.5, №.1. С. 1—20.

Суховеева М.В. Водоросли сублиторали Южно-Курильского мелководья: исслед. по биол. рыб и промысл. океанографии. Владивосток: ТИНРО, 1972. Вып. 7. С. 88—99.

Суховеева М.В. Состояние запасов, распределение ламинарии и некоторых других водорослей у берегов Приморья. Владивосток: ТИНРО, 1969. 23 с.

Суховеева М.В., Подкорытова А.В. Промысловые водоросли и травы морей Дальнего Востока: Биология, распространение, запасы, технология переработки. Владивосток: ТИНРО-Центр, 2006. 243 с.

Таболин В.А., Яковлев М.Ю., Ильина А.Я. и др. Патогенетические механизмы и клинические аспекты действия термостабильного эндотоксина кишечной микрофлоры // Русский мед. журн. 2003. Т. 11, №. 3. С. 55—60.

Тертов В.В., Собенин И.А., Лазарева В.Л. и др. Взаимодействие множественно-модификационных (десиализированных) ЛПНП, выделенных из крови больных атеросклерозом, с клеточными рецепторами // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1994. №. 1. С. 53—55.

Титов В.Н. Нарушение транспорта в клетки насыщенных жирных кислот в патогенезе эссенциальной гипертензии. // Вопр. мед. химии. 1999. №. 6. С. 21—28.

Титов В.Н. Транспорт липопротеинами (транспортными макромолекулами) насыщенных и полиеновых жирных кислот (гипотеза) // Вопр.

биол. мед. фарм. химии. 2000. №. 3. С. 3—10.

Толстикова Н.Е. Доминирующие виды водорослей в Анадырском заливе Берингова моря и перспективы развития их промысла // Растит. ресурсы. 1982. Т. 18, вып. 2. С. 265—267.

Тотолян А.А., Фрейдлин И.С. Клетки иммунной системы. Спб.: Наука. 2000. 231 с.

Тутельян В.А. Микронутриенты в питании здорового и больного человека. М.: Колос. 2002. 424 с.

Усов А.И., Билан М.И. Фукоиданы — сульфатированные полисахариды бурых водорослей // Успехи химии. 2009. Т. 78, № 8. С. 846.

Усов А.И., Кошелева Е.А., Яковлев А.П. Полисахариды водорослей. XXXV. Полисахаридный состав некоторых бурых водорослей Японского моря // Биоорганич. химия. 1985. Т. 11, №. 6. С. 830—835.

Усов А.И., Крупнова Т.Н. Polysaccharide composition of the new species of brown seaweeds, *Tauya basicrassa* Kloczc. et Krupn. (*Laminariaceae*, *Laminariales*). // Abstract of The Fourth Asian-Pacific Phycological Forum. 2005. Bangkok. Thailand. P. 54.

Усов А.И., Смирнова Г.П., Билан М.И. и др. Полисахариды водорослей 53. Бурая водоросль *Laminaria saccharina* (L.) Lam. как источник фукоидана // Биоорганич. химия. 1998. Т. 24, № 6. С. 437—445.

Усов А.И., Смирнова Г.П., Ключкова Н.Г. Полисахаридный состав некоторых бурых водорослей Камчатки // Биоорганич. химия. 2001. Т. 27, № 6. С. 444—448.

Усов А.И., Смирнова Г.П., Ключкова Н.Г. Полисахариды водорослей. Сообщение 58. Полисахаридный состав тихоокеанской бурой водоросли *Alaria fistulosa* P.et R. (*Alariaceae*, *Laminariales*) // Изв. АН. Сер. Хим. 2005. №. 5. С. 1245—1249.

Усов А.И., Ушакова Н.А., Нифантьев Н.Э. и др. Сульфатированные полисахариды из морских водорослей: структура и биологическая активность // Биомед. химия. 2008. №.5. С. 597—606.

Усов А.И., Чижов А.О. Полисахариды водорослей XL. Углеводный состав бурой водоросли *Chorda filum* // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15, № 2. С. 208—216.

Усов А.И., Кирьянов А.В. Полисахариды водорослей. 47. Выделение фракций фукоидана из бурой водоросли *Laminaria cichorioides* Miyabe // Биоорганич. химия. 1994. Т. 20, № 12. С. 1342—1348.

Устюжанина Н.Е. Синтез и конформационный анализ фрагментов фукоиданов // Тез. Менделеевского съезда. Казань, 2003. С. 45.

Утешев Д.Б., Сергеев А.В. Апоптоз. Фармакологические аспекты. // Эксперим. клин. фармакология. 1998. № 4. С. 57—65.

Ушакова Н.А., Михайлов В.И., Мазуров А.В. и др. Ингибиторы селек-тин-опосредованного воспаления // Вопр. мед. химии. 1999. №. 5. С. 447.

Ушакова Н.А., Морозевич Г.Е., Устюжанина Н.Е. и др. Антикоагулянтная активность фукоиданов из бурых водорослей // Биомед. химия. 2008. Т. 54, вып. 5. С. 597–606.

Ушакова Н.А., Преображенская М.Е., Берд М.И. и др. Мономерные и мультимерные блокаторы селектинов: сравнение активности *in vitro* и *in vivo* // Биохимия. 2005. Т.70, №4. С. 523–532.

Фильченков А., Завелевич М., Храновская Н., и др. Изучение способности фукоиданов из дальневосточных бурых водорослей модулировать апоптоз клеток МТ-4 лейкоза человека *in vitro* // Биотерапия. 2006. Т. 5, № 4. С. 30–37.

Фильченков А., Завилевич М., Имбс Т. и др. Повышение чувствительности злокачественных лимфоидных клеток человека к этопозиду при действии фукоидана полисахарида бурых водорослей // Эксперим. онкология. 2007. Т. 29, № 3. С. 181–185.

Фильченков А.А. Терапевтическое использование модуляторов апоптоза в онкологической практике: реалии и перспективы // Онкология XXI: Тр. науч.-практ. конф. Киев. 2003. С. 10.

Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции // Иммунология. 2001. №. 5. С. 4–8.

Хаитов Р.М. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 636 с.

Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления о защите организма от инфекции // Иммунология. 2002. №. 1. С. 61–64.

Хасина Э.И., Сгребнева М.Н., Ермак И.М., Малеев В.В. Влияние каррагинана на неспецифическую резистентность мышей к ЛПС-индуцированной эндотоксемии // Журн. микробиологии. 2007. №. 2. С. 57–60.

Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф., Соколова Е.В. И др. Изучение *in vivo* и *ex vitro* антиоксидантной активности каррагинанов - сульфатированных полисахаридов красных водорослей // Бюл. эксперим. биол. мед. 2010. №. 10. С. 398–401.

Хорева М.В., Ковальчук Л.В., Варивода А.С., Грачева Л.А. Подходы к оценке рецепторов врожденного иммунитета // Российский иммунол. журн. 2008. Т.2, №. 2-3. С. 151–156.

Хотимченко Ю.С. Противоопухолевые свойства некрахмальных полисахаридов: фукоиданы, хитозаны // Биология моря. 2010. Т. 36, № 6. С. 399–409.

Хотимченко Ю.С., Ковалев В.В., Савченко О.В. и др. Физико-химические свойства, физиологическая активность и применение альгинатов - полисахаридов бурых водорослей // Биология моря. 2001. Т. 27, №. 3. С. 151–162.

Цзен Чен Куй, У Чжао Юань. Разведение морской капусты и связанные с этим проблемы // Бот. журн. АН СССР. 1956. Т. 4, вып. 2. С. 182–192.

Цодиков Г.В., Зякун А.М., Климова Е.В. Достижения и перспективы изучения *Helicobacter pylori* – инфекции // Эпидемиология и инфекц. болезни. 2011. №.2. С. 46–49.

Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А. и др. Цитокиновый баланс в патогенезе системного воспалительного ответа: новая мишень иммуно-терапевтических воздействий при лечении сепсиса // Мед. иммунология. 2001. Т.3, №.3. С. 415–429.

Чикилева И.О., Караулов Л.В., Анисимова Н.Ю. и др. Двойственная роль толлподобных рецепторов в регуляции противоопухолевого иммунитета // Иммунология. 2010, №.1. С. 52–55.

Чудаева В.А. Вещественная характеристика речного стока западной части Япономорского бассейна. Геохимия и минералогия осадочных комплексов Дальнего Востока. Владивосток: ТИГ АН СССР ДВНЦ, 1979. С. 151–171.

Чудаева В.А. Малые элементы в речном стоке западной части Япономорского бассейна. Процессы миграции веществ в береговой зоне. Владивосток: ТИГ АН СССР ДВНЦ, 1978. С. 51–55.

Шевченко Н.М., Анастюк С.Д., Герасименко Н.И. и др. Полисахаридный и липидный состав бурой водоросли *Laminaria gurjanovae* // Биоорган. химия. 2007. Т. 33, № 1. С. 96–107.

Шкундина И.С., Тер-Аванесян М.Д. Прионы // Успехи биол. химии. 2006. Т.46, № 1. С. 3–42.

Эндакова Э.А., Новгородцева Т.П., Светашев В.И. Модификация состава жирных кислот крови при сердечно-сосудистых заболеваниях. Владивосток: Дальнаука, 2002. 296 с.

Яковлев М.Ю. Системная эндотоксемия в физиологии и патологии человека: автореф дис. ... д-ра. мед. наук. М.: РАМПО. 1993. 58 с.

Яковлев М.Ю. Эндотоксиновая агрессия как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных // Успехи соврем. биол. 2003. Т. 123, №. 1. С. 31–40.

Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии. М.: Медицина, 2001. С. 13–56.

Ярилин А.А. Основы иммунологии. М.: Медицина, 1999. 606 с.

