

**М.А. Дергунова, С.Я. Жанаева, Е.Е. Филюшина, И.И. Бузуева,
О.П. Колесникова, Г. Коган, Т.А. Короленко**

ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ β-1,3-D-ГЛИКАНОВ КАК СТИМУЛЯТОРОВ МАКРОФАГОВ

ГУ НИИ физиологии СО РАМН, Новосибирск

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск.

Институт химии Словацкой АН, Братислава, Словакия

Оценивали биологическую активность водорастворимого β-1,3-D-хитокарбоксиметилгликана (Хито-КМГ) как нового стимулятора макрофагов в сравнении с изученным ранее карбоксиметилированным β-1,3-D-гликаном (КМГ). Показано, что однократное внутрибрюшинное введение КМГ и ХитоКМГ мышам линии СВА в дозе 25 мг/кг приводило к увеличению количества лейкоцитов преимущественно миелоидного ряда в костном мозге мышей: на 2-е сутки после введения КМГ абсолютное количество нейтрофильных лейкоцитов увеличивалось в 1,3 раза, а при введении ХитоКМГ — в 1,5 раза. Количество моноцитарных клеток в этот же период в костном мозге возрастало соответственно в 2,1 и 2,5 раза. Оба гликана увеличивали количество макрофагов в печени и повышали в них число вторичных лизосом (морфологические признаки стимуляции макрофагов). Введение гликанов приводило к увеличению клиренса углерода (в 1,8-2 раза), что отражает усиление фагоцитарной активности макрофагов; увеличивало выработку ФНО-α перитонеальными макрофагами, причем ХитоКМГ в 1,7 раза больше, чем КМГ. Введение КМГ или Хито-КМГ приводило к увеличению свободной активности кислой фосфатазы в гомогенате печени (1 сут., 7 сут.), что свидетельствует о лабильности лизосом. Активность фермента сыворотки крови хитотриозидазы, отражающей активность макрофагов, повышена при воздействии обоих соединений. Полученные данные позволяют заключить, что водорастворимые КМГ и Хито-КМГ проявляют сходную биологическую активность, стимулируя макрофаги *in vivo*, и являются перспективными для клинического использования.

Ключевые слова: β-1,3-D-гликаны, макрофаги печени, активность лизосомальных ферментов

В быстро увеличивающейся группе иммуномодулирующих соединений важное место занимают лизосомотропные препараты — β-1,3-D гликаны [17]. β-1,3-D гликаны являются основными компонентами клеточных стенок дрожжей, грибов, некоторых бактерий, а также растений, выполняют функцию структурного каркаса клеточных стенок и определяют их форму и жесткость [10]. Молекулы гликана образуют цепи глюкопиранозильных единиц, соединенных β-1,3-гликозидными связями. Главная цепь разветвляется посредством боковых β-1,6-гликозидных связей. Химические и биологические свойства гликанов зависят от типа и соотношения гликозидных связей, надмолекулярной структуры, растворимости соединений, их способности к гелеобразованию [3, 18].

Показано, что β-1,3-D-гликаны усиливают функциональную активность лейкоцитов, стимулируют фагоцитоз макрофагов, при этом идет интенсивная генерация кисло-

родных радикалов [8], секретируется широкий спектр медиаторов воспаления, цитокинов [15], увеличивается активность лизосомальных ферментов в сыворотке крови и лейкоцитах [11]. Гликаны оказывают стимулирующее действие на Т-клеточный иммунитет, увеличивают секрецию IL-6, IL-8, IL-12 макрофагами [7], нейтрофилами [14] и NK- клетками [12]. Недавно обнаружено, что β-1,3-D-гликаны взаимодействуют с клетками СМФ посредством рецептора дектина-1, этот гликановый рецептор представляет собой полипептид, состоящий из 247 аминокислот, является трипсинчувствительным и кальций- и магний-зависимым [5, 13], локализуется в 6-й хромосоме, у человека — в 12-й хромосоме, а mRNA экспрессируется в высокой степени дендритными клетками и макрофагами [9, 16].

В настоящее время широко изучается биологическая активность водорастворимых форм β-1,3-D гликанов, которые сохраняют иммуномодулирующие свойства нерастворимых форм и являются клинически наиболее перспективными.

Хито-КМГ, в основном водорастворимое производное β -1,3-D гликанов, имеет известное химическое строение, не требует значительных средств при производстве (используются компоненты отходов промышленного производства лимонной кислоты), однако его биологическая активность не исследована. В данной работе оценивали биологическую активность этого соединения в качестве нового стимулятора СМФ в сравнении с изученным ранее КМГ.

Материалы и методы

Эксперименты проведены на взрослых самцах мышей линии СВА, массой 20-25 г (виварий Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск). Эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. №755).

КМГ и Хито-КМГ (препарат производства Института химии Словацкой АН) вводили животным однократно в дозе 25 мг/кг массы внутривенно, мышей забивали через 48 ч и 7 суток после введения препарата. Контрольным животным вводили внутривенно соответствующий объем физиологического раствора. После забоя мышей печень гомогенизировали в 0,25 М растворе сахарозы с 0,001 М ЭДТА и использовали для определения активности ферментов. Подсчет общего количества миелокариоцитов и приготовление мазка костного мозга для подсчета миелограмм проводили согласно рекомендациям Гольдберга Е.Д. с соавт. [1].

Общую поглотительную способность макрофагов определяли по способности очищать кровь от частиц коллоидного углерода. Взвесь коллоидного углерода вводили животным под легким эфирным наркозом в хвостовую вену, в дозе 0,1 мл на 25 г массы. Элиминацию частиц углерода из крови оценивали путем забора крови из ретроорбитального синуса животных в объеме 100 мкл через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 минут. Определяли оптическую плотность спектрофотометрически при 650 нм. Скорость очищения крови от частиц коллоидного углерода или К-индексы находили по формуле $K = \log 2/T_{1/2}$, где $T_{1/2}$ — время полувыведения коллоида из крови в минутах.

Для морфометрического электронно-микроскопического исследования образцы печени фиксировали в растворе глутарового альдегида в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4. Дегидратированные ткани заключали в Эпон-812. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-8800 (Швеция), контрастировали в растворе уранил ацетата и цитрата свинца и срезы исследовали в электронном микроскопе JEM-7A и JEM-100S

(Япония). Для морфометрического исследования использовали не менее 20 макрофагальных клеток.

Определение активности ФНО- α проводили по методике Flik D.A., Gifford G.E. [6].

Активность кислой фосфатазы определяли спектрофотометрическим методом, основанном на определении количества неорганического фосфата, освобожденного в результате ферментативного гидролиза β -глицерофосфата натрия [4].

Активность хитотриозидазы — фермента лизосом, свидетельствующего об активации макрофагов, проводили, используя флуоресцентный субстрат 4-метилуббеллиферил-хитотриозид (Сигма, США), используя спектрофлуориметр Perkin Elmer 650-10S. Результаты выражали в нмоль МУФ/мл в час.

Данные обрабатывали статистически методом параллельных рядов вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Введение животным КМГ или ХитоКМГ приводило к повышению количества лейкоцитов преимущественно миелоидного ряда в костном мозге на протяжении всего периода наблюдения: на 2-е сутки после введения КМГ абсолютное количество нейтрофильных лейкоцитов в костном мозге увеличивалось в 1,3 раза, а при введении ХитоКМГ — в 1,5 раза. Количество моноцитарных клеток в этот же период возросло в 2,1 и 2,5 раза соответственно. Увеличивалось количество зрелых элементов, вероятно, в связи с ускорением созревания этих клеток. Содержание лимфоидных клеток в костном мозге на протяжении всего периода исследования достоверно не изменялось (Таблица 1).

Ранее нами было показано, что у интактных животных Хито-КМГ (25 мг/кг, внутривенно) повышал общее количество лейкоцитов периферической крови и значительно (в 2 раза) — количество моноцитов. Эти результаты также свидетельствуют о стимуляции Хито-КМГ гранулоцитарно-макрофагального ростка. Они согласуются с данными литературы, где одним из возможных механизмов иммуностимулирующего действия гликанов является усиление синтеза активированными макрофагами колониестимулирующих факторов, фактора индукции моноцитопоэза, которые усиливают образование клеток грануло- и моноцитарного ряда в костном мозге и поступление моноцитов из костного мозга в кровь, вследствие чего пополняется пул тканевых периферических макрофагов и увеличивается число Купферовских клеток [2, 15]. Гранулоцитарномакрофагальный КСФ усиливает способность моноцитов и

Таблица 1

Влияние КМГ и ХитоКМГ (25 мг/кг, в/в) на клеточный состав костного мозга бедренной кости мышей

Группы животных	Общее количество миеокариотонов * 10 ⁶ /б	Общее количество нейтрофилов	Проллиферирующие нейтрофилы	Индекс созревания	Эозинофилы	Моноциты	Лимфоциты
Контроль	21,8±1,29	8,22±0,56	2,73±0,3	3,01±0,28	1,25±0,07	0,51±0,01	2,01±0,12
КМГ, 2 сут.	42,12±3,24*	10,92±0,47	4,79±0,06*	2,24±0,12	1,2±0,09	1,1±0,04*	2,4±0,39
КМГ, 7 сут.	38,52±1,61*	10,75±0,29	4,56±0,42*	2,39±0,24	1,08±0,01	1,08±0,09*	2,2±0,21
ХитоКМГ, 2 сут.	44,5±3,14*	12,73±0,98*	5,56±0,21*	2,09±0,51	1,28±0,03	1,28±0,12*	2,9±0,39
ХитоКМГ, 7 сут.	38,82±2,41*	12,57±0,74*	5,68±0,39*	2,21±0,17	1,09±0,05	1,09±0,08*	2,7±0,26

Примечание. * — $p < 0,01$ по сравнению с контролем. Количество животных в контрольной группе — 10, в опытных — 8-10

макрофагов к презентации антигенов (увеличение экспрессии мембранной формы II-1 и молекул класса 2 системы HLA), что ведет к повышению их функциональной активности, в том числе усиливается фагоцитарная активность макрофагов [13].

КМГ и Хито-КМГ при внутрибрюшинном введении усиливали фагоцитарную активность макрофагов. На 4-е сутки после в/б введения КМГ в дозе 25 мг/кг скорость клиренса углерода увеличивалась в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой животных. Внутривенное введение КМГ в той же дозе вызывало более ранний и выраженный эффект на 1-е сутки в 1,8 раза по сравнению с в/б введением (или контрольной группой). ХитоКМГ (25 мг/кг) при в/б введении увеличивал клиренс углерода в 1,7 раза на 4-е сутки по сравнению с контролем, при в/в введении поглотительная способность клеток печени увеличивалась в 2 раза уже на 1 сутки по сравнению с контрольной группой животных (Рис. 1).

Таким образом, оба гликана оказывали сходный эффект, активируя поглотительную способность макрофагов печени. Достоверных отличий в способности КМГ или ХитоКМГ не наблюдалось, наиболее эффективен в/в способ введения исследуемых соединений.

Защитное действие полисахаридов не сводится только к усилению фагоцитарной активности МФ. Стимулированные МФ секретируют широкий спектр БАВ, в том числе и ФНО- α .

Обнаружено, что исследуемые гликаны увеличивали выработку ФНО- α , причем при одинаковых дозах ХитоКМГ в 1,7 раза больше, чем КМГ. ХитоКМГ в дозе 25 мг/кг повышал уровень ФНО- α , как и зимозан в дозе 50 мг/кг (Таблица 2).

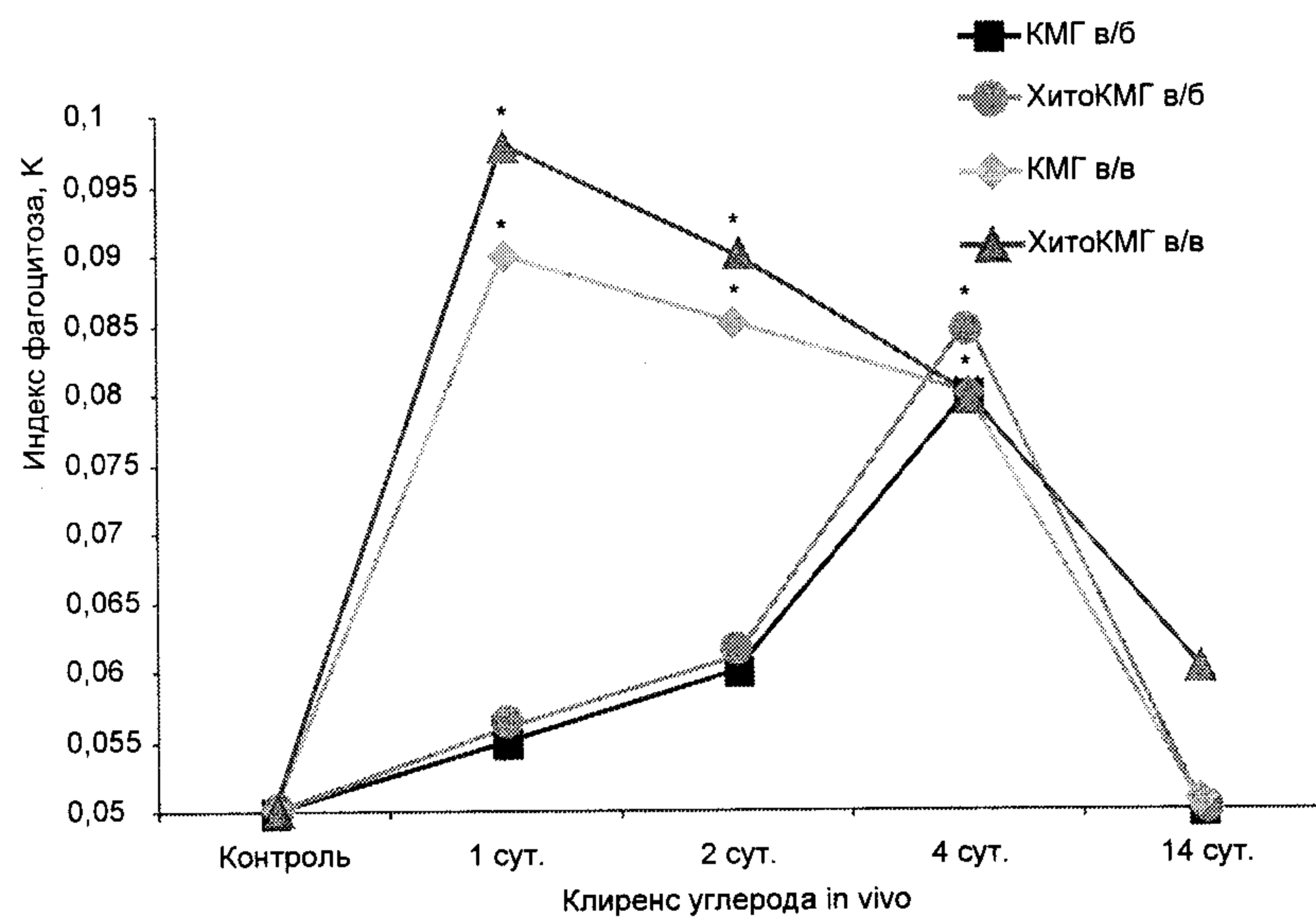


Рис. 1. Стимуляция макрофагов КМГ и хитоКМК 25 мг/кг *in vivo*
* $P < 0,05$ по сравнению с контролем. Количество животных в каждой группе — 5

Таблица 2
Влияние КМГ, ХитоКМГ (25 мг/кг, в/в), зимозана (50 мг/кг, в/в) на активность ФНО- α сыворотки мышей СВА/С57В1

Группы животных	ФНО- α , пг/мл
Контроль	333±50
КМГ — 7 сут, 25 мг/кг	831±42*
ХитоКМГ — 7 сут, 25 мг/кг	1427±102* **
Зимозан — 7 сут, 50 мг/кг	1560±160 *

Примечание. * — $p < 0,01$ по сравнению с контролем, ** — $p < 0,05$ — по сравнению с серией КМГ — 7 сут. (через 7 суток после введения КМГ). Количество животных в каждой группе — 5

Таблица 3

Морфометрические показатели макрофагов печени при воздействии ХитоКМГ и КМГ

Параметры	Контроль	КМГ-2 сут	КМГ-7 сут	ХитоКМГ-7 сут
Численная плотность макрофагов (на 1 мм ²)	924,5±38,0	1412,5±92,0*	1782,8±57,3* **	1407,0±48,5* ***
Площадь поперечного сечения цитоплазмы (мкм ²)	33,5±3,4	48,03±5,11*	42,74±3,66	37,36±3,74
Относительный объем первичных лизосом, %	3,8±0,5	1,05±0,14*	1,19±0,08*	2,34±0,41* ***
Относительный объем вторичных лизосом, %	6,1±1,3	19,51±2,72*	16,43±1,66*	7,05±1,45***
Численная плотность первичных лизосом (на 10 мкм ²)	18,8±0,7	5,42±0,60*	5,84±0,48*	7,42±0,64* ***
Численная плотность вторичных лизосом (на 10 мкм ²)	1,7±0,3	9,73±1,13*	7,18±0,74*	3,52±0,70* ***

Примечание. * — $p < 0,01$ по сравнению с контролем. ** — $p < 0,01$ по сравнению с серией КМГ-2 сут. *** — $p < 0,01$ по сравнению с серией КМГ-7 сут.

При морфометрическом электронно-микроскопическом исследовании обнаружены признаки стимуляции макрофагов печени в сравнении с контрольными животными. Показано, что оба исследуемые соединения проявляли сходный эффект, увеличивая численную плотность синусоидальных клеток печени (преимущественно макрофагов), увеличивая численную плотность вторичных лизосом (в последнем случае более выражен эффект у КМГ) (Таблица 3).

Свободная активность кислой фосфатазы гомогената печени увеличена при воздействии хитокарбоксиметилглюкана и карбоксиметилглюкана (1 сут., 7 сут.) в одинаковой степени, что свидетельствует о лабильности лизосом вследствие преобладания вторичных лизосом в популяции частиц (Рис. 2).

Последние годы отмечен значительный интерес к недавно открытому ферменту лизосом — хитотриозидазе. Считается, что источником поступления в кровь этого фермента являются ак-

тивированные макрофаги. Активность хитотриозидазы сыворотки крови повышена при воздействии обоих соединений — КМГ и ХитоКМГ (Рис. 3). Это свидетельствует о способности гликанов стимулировать макрофаги. У человека хитотриозидаза обнаруживает макрофагальную локализацию, поэтому предполагают, что повышение активности хитотриозидазы в сыворотке крови имеет макрофагальное происхождение. У мышей и крыс происхождение сывороточной хитотриозидазы изучено не достаточно. Нами ранее показано, что селективная депрессия макрофагов печени с помощью введения крысам и мышам хлористого гадолиния вызывает снижение активности хитотриозидазы сыворотки крови, однако причины этого не известны.

Полученные нами данные позволяют заключить, что КМГ и ХитоКМГ проявляют сходную биологическую активность, стимулируя макрофаги *in vivo*, и являются перспективными для клинического исследования.

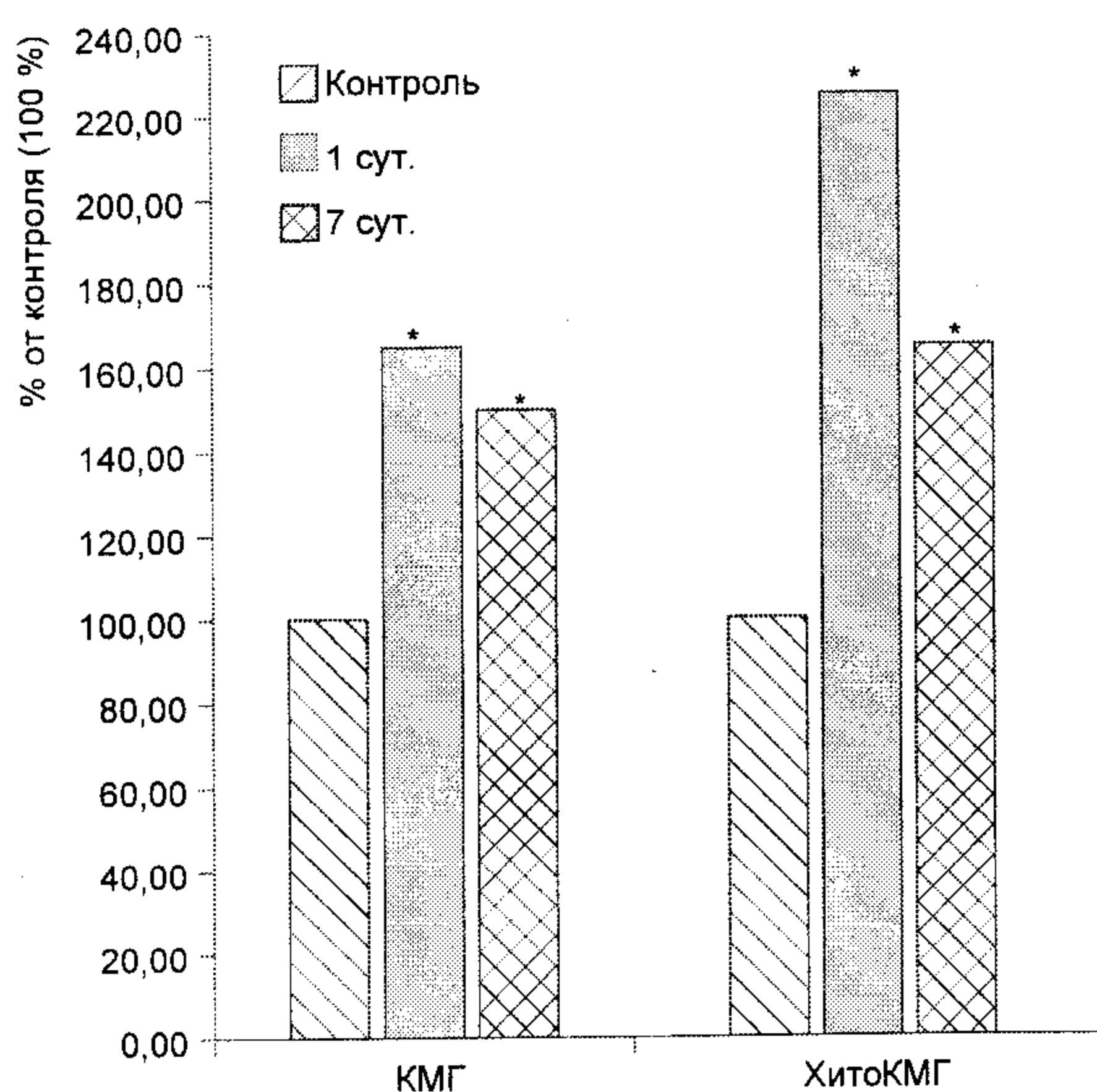


Рис. 2. Свободная активность кислой фосфатазы в гомогенате печени мышей при введении КМГ и ХитоКМГ * — $P < 0,05$ по сравнению с контролем. Количество животных в каждой группе — 10. Свободная активность кислой фосфатазы выражена в процентах от общей активности

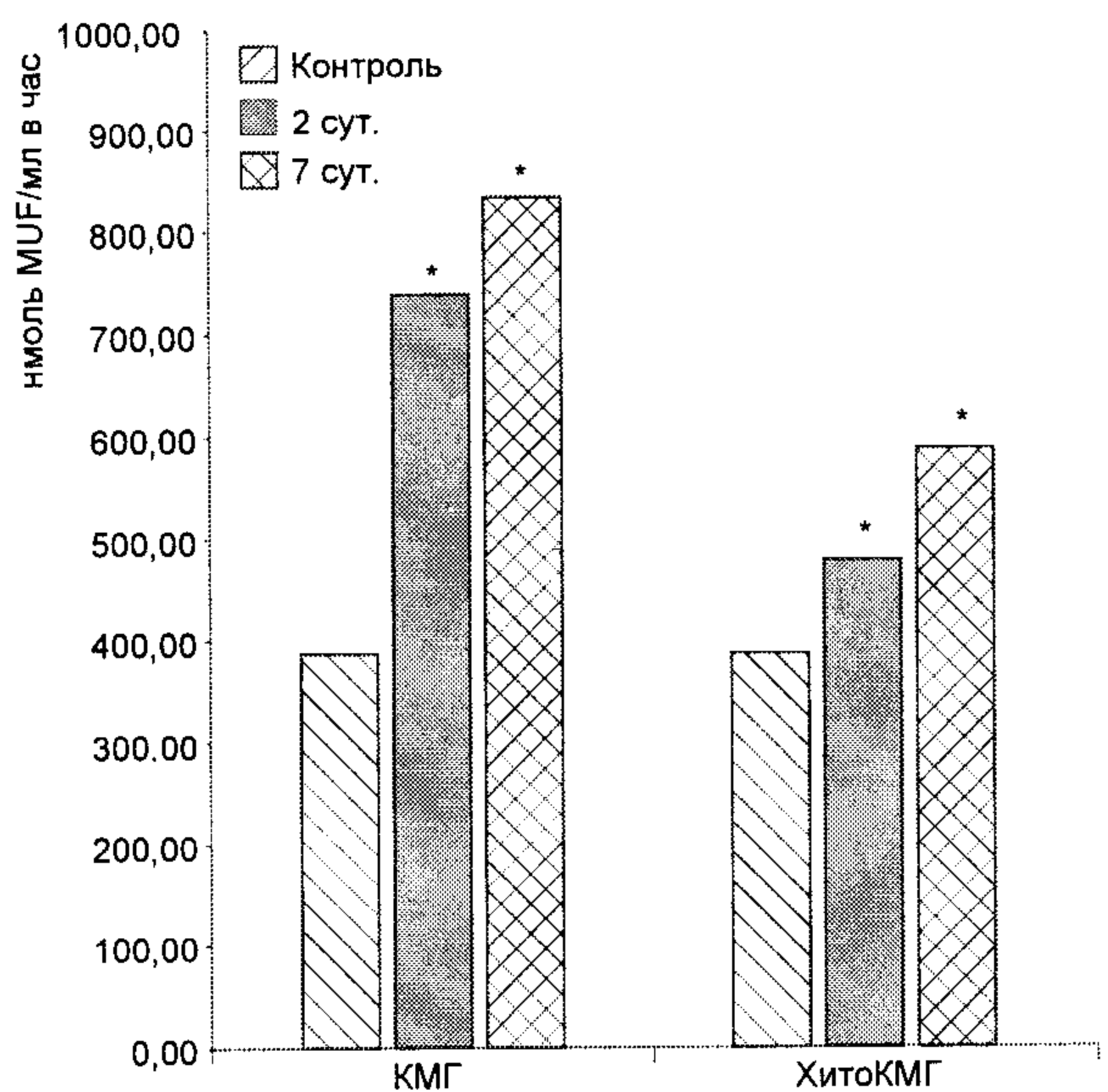


Рис. 3. Влияние введения КМГ и ХитоКМГ на активность хитотриозидазы в сыворотке крови мышей * — $P < 0,01$ по сравнению с контролем. Количество животных в каждой группе — 10

FEATURES OF NEW CHEMICALLY MODIFIED β -1,3-D-GLUCANS AS MACROPHAGE STIMULATORS

M.A. Dergunova, S.Ya. Zhanaeva, E.E. Filushina,
I.I. Buzueva, O.P. Kolesnikova, G. Kogan,
T.A. Korolenko

Biological activity of water-soluble carboxymethylated β -1,3-glucan (CMG) and chitocarboxymethylated β -1,3-glucan (ChitoCMG) exerting macrophage stimulating properties in vivo (maximal at the 2nd-5th days) was studied during parenteral (i.p. and i.v.) mode of administration in a dose of 25 mg/kg to CBA/C57Bl mice. Intravenous injection of both glucans was followed by increased PMN leukocytes and monocytes number in peripheral blood (ChitoCMG >CMG). Intraperitoneal administration of CMG and ChitoCMG increased the rate of carbon particle phagocytosis by macrophages. Increased serum chitotriosidase activity in CBA/C57Bl mice was shown during CMG and ChitoCMG administration reflecting increased host defense mechanisms. TNF- α production was increased both during administration of CMG and Chito-CMG. Electron microscopy morphometric study revealed increased number of liver macrophages and number of secondary lysosomes inside them during administration of both glucans studied. One can conclude that CMG and ChitoCMG are perspective as non-toxic immunomodulators acting as macrophage stimulators during parenteral mode of administration.

Литература

1. Гольдберг Е.Д. Методы культуры ткани в гематологии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов. — Томск, 1992. — С. 264.
2. Лукина Е.А. Система мононуклеарных фагоцитов и биологические эффекты провоспалительных цитокинов. / Лукина Е.А. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 1999. — № 5. — С. 7-13.
3. Шандула Й. Структура и некоторые характеристики дрожжевых β -гликанов / Й. Шандула, Г. Коган, Л. Маслер // Бюл. exper. биол. — 1990. — № 7. — С. 39-42.
4. Barrett A.J. Lysosomal enzymes / A.J. Barrett // Lysosomes a laboratory handbook / J.T. Dingle ed. — Amsterdam — London North Holland. — 1972. — P. 46-135.
5. Dectin-1 is a major β -glucan receptor on macrophages / G.D. Brown, P.R. Taylor, et. al. // J. Exp. Med. — 2002. — Vol. 196. — № 3. — P. 407-412.

6. Flik D.A. Pharmacokinetics of murine tumor necrosis factor / D.A. Flik, G.E. Gifford // J. Immunopharmacol. — 1986. — Vol. 8. — P. 89-97.
7. Peptide mimics of the CTLA4-binding domain stimulate T- cell proliferation / T. Fukumoto, N. Torigoe, et. al. // Natl. Biotechnol. — 1998. — Vol. 16. — P. 267-270.
8. Nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages by fungal β -glucans / T. Hashimoto, N. Ohno, et. al. // Biol. Pharm. Bull. — 1997. — Vol. 20. — P. 1006-1009.
9. Hernandez-Falcon P.I.A. Cloning of human dectin-1, a novel C-type lectin — like receptor gene expressed on dendritic cells / P.I.A. Hernandez-Falcon, P. Rora-Novarro, E. Fernandez-Ruiz // Immunogenetics. — 2001. — Vol. 53. — P. 288-295.
10. Increased efficiency of Lewis lung carcinoma chemotherapy with a macrophage stimulator — yeast carboxymethyl glucan / G. Kogan, J. Sandula, T. Korolenko, et. al. // International Immunopharmacology. — 2002. — Vol. 2. — P. 775-781.
11. Increased resistance to Staphylococcus aureus infection and enhancement in serum lysozyme activity by β -glucan / P.L. Kokoshis, D. L. Williams, D. L. Cook, et. al. // Science. — 1988. — Vol. 199. — P. 1340-1342.
12. Medzhitov R. Innt immunity impact on the adaptive immune response / R. Medzhitov, C.A. Janeway // Curr. Opin. Immunol. — 1997. — Vol. 9. — P. 4-9.
13. Antigen-specific response of murine immune system toward a yeast β -glucan preparation, zymosan / T. Miura, N. Ohno, N. Miura, et. al. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 1999. — Vol. 24. — P. 131-139.
14. Induction of tumoricidal activity of polymorphonuclear leukocytes by liner β -1,3-D-glucan and other immunomodulators in murine cells / K. Morikawa, R. Taceda, M. Yamazaki, et. al. // Cancer Res. — 1985. — Vol. 45. — P. 1496-1501.
15. Therapeutic intervention with comlement and β -glucan in cancer / G.D. Ross, V. Vetviska, et. al. // Immunopharmacol. — 1999. — Vol. 42. — P. 61-74.
16. The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages / P. R. Taylor, D. Brown, M. Reid, et. al. // J. Immunol. — 2002. — Vol. 169. — P. 3876-3882.
17. Williams D.L. Overview of β -(1,3)-D-glucan immunobiology / D. L. Williams // Mediators Inflamm. — 1997. — Vol. 6. — P. 247-250.
18. Yadomae T. Immunopharmacological activity of β -glucan: structure-activity relationship in relation to various conformations / T. Yadomae // Jpn. J. Med. Mycol. — 1992. — Vol. 33. — P. 267-277.