

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЕБИОТИЧЕСКИХ, ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ФУКОЗЫ И ЕЕ ВЛИЯНИЯ НА РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий, ²Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко; ³НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва

Цель. Исследование влияния фукозы в рационе питания на микрофлору ЖКТ опытных животных с экспериментальным дисбиозом, гуморальные факторы неспецифического иммунитета, а также степень фукозилирования ооцитов и долю способных к оплодотворению яйцеклеток. *Материалы и методы.* Пребиотические свойства фукозы изучали путем анализа просветной микрофлоры опытных мышей на фоне экспериментального дисбиоза. Исследование факторов неспецифического иммунитета проводили после иммунизации мышей по уровню антителообразования в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Степень фукозилирования ооцитов оценивали по интенсивности их свечения при микроскопировании яйцеклеток опытных мышей на флуоресцентном микроскопе. *Результаты.* Применение фукозы во всех испытанных дозах приводило к восстановлению состава и численности микрофлоры ЖКТ. Для коррекции дисбиоза оптимальной являлась концентрация фукозы 0,02% от массы тела опытных животных. Включение фукозы в диету опытных животных в дозировке 0,008 % от массы тела обеспечивало самый высокий уровень иммунного ответа. При добавлении в рацион мышей фукозы в дозировке 0,008 % наблюдалось увеличение степени фукозилирования ооцитов, доли способных к оплодотворению яйцеклеток. *Заключение.* Установлена бифидогенная и лактогенная активность фукозы. Показана способность фукозы стимулировать повышение уровня антител в сыворотке крови. Выявлена тенденция положительного влияния фукозы в рационе мышей на степень фукозилирования ооцитов.

Журн. микробиол., 2018, № 6, С. 110—114

Ключевые слова: фукоза, пребиотики, иммунитет, ооцит, фукозилирование

INVESTIGATION OF PREBIOTIC, IMMUNOSTIMULATING PROPERTIES OF FUCOSE AND ITS EFFECT ON REPRODUCTIVE FUNCTION

¹Voronezh State University of Engineering Technologies, ²Burdenko Voronezh State Medical University; ³Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Aim. Investigation of the effect of fucose in the diet on the gastrointestinal microflora of experimental animals with experimental dysbiosis, the humoral factors of nonspecific immunity, as well as the degree of fucosylation of oocytes and the proportion of oocytes that can be fertilized. *Materials and methods.* Prebiotic properties of fucose were studied by analyzing the luminal microflora of experimental mice against the background of experimental dysbiosis. Investigation of factors of nonspecific immunity was carried out after immunization of mice according to the level of antibody formation in blood serum by the method of enzyme immunoassay. The degree of fucosylation of oocytes was assessed by the intensity of their luminescence upon microscopy of oocytes of experimental mice on a fluorescent microscope. *Results.* The use of fucose in all tested doses led to the restoration of the composition and quantity of the gastrointestinal microflora. For the correction of dysbiosis, the optimal concentration of fucose was 0.02% of the body weight of the experimental animals. Inclusion of fucose in a diet of experimental animals in the amount of 0.008% to the body weight provided the highest level of immune response. The degree of fucosylation of oocytes, the proportion of oocytes capable of fertilization was increased when fucose were introduced in the amount of 0.008% to the body weight of the mice. *Conclusion.* Bifidogenic and lactogenic activity of fucose is established. The ability of fucose to stimulate an increase in the level of antibodies in in blood serum is shown. The tendency of positive effect of fucose in the diet of mice on the degree of fucosylation of oocytes was revealed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 6, P. 110—114

Key words: fucose, prebiotics, immunity, oocyte, fucosylation

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы большое внимание привлекают процессы фукозилирования биомолекул, указывающие на фундаментальную роль фукозы в различных биологических процессах. L-фукоза входит в состав многих гликанов, гликопротеинов и гликолипидов, в том числе олигосахаридных структур клеточных мембран. Молекула фукозы присутствует в антигенах групп крови АВН и в некоторых олигосахаридных структурах, принадлежащих к антигенам Льюиса [8]. Фукоза играет важную роль во многих физиологических процессах, таких как эмбриогенез, апоптоз, передача нейронов, адгезия лейкоцитов, оплодотворение, развитие плода [8]. Рассматривается возможность использования фукозы в качестве биомаркера при различных заболеваниях, в том числе раке молочной железы [6]. Известно также, что фукоза является незаменимым углеводным компонентом иммуноглобулинов и лектинов, участвует в реакциях высокоспецифичных белок-белковых взаимодействий [7], межклеточного узнавания, процессах онтогенеза и клеточной дифференциации [9]. Учитывая, что микрофлора ЖКТ участвует в стимуляции локального иммунитета [1, 4], актуальным является исследование пребиотических свойств фукозы. Имеются данные о том, что бифидобактерии способны к росту и развитию на средах с фукозой в качестве единственного источника углевода [2], однако пребиотическая активность фукозы *in vivo* изучена недостаточно.

Имеются сведения о том, что фукоза непосредственно участвует и в репродуктивных процессах. Многие исследователи отмечают важную роль фукозилирования ооцитов в процессах оплодотворения у позвоночных. Установлено, что остатки фукозы сконцентрированы на поверхности яйцеклетки и непосредственно участвуют в распознавании и адгезии сперматозоида к оболочке ооцита за счет фукозидазы, локализованной на акросоме [5, 10, 11].

Цель работы — исследование влияния фукозы на микрофлору желудочно-кишечного тракта опытных животных с экспериментальным дисбиозом, гуморальные факторы неспецифического иммунитета, а также степень фукозилирования ооцитов и долю способных к оплодотворению яйцеклеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пребиотические свойства фукозы в опытах *in vivo* изучали на белых беспородных мышах массой 16-18 г при пероральном введении возрастающих доз препарата (0,01%, 0,02% и 0,04% от массы тела) в течение 14 суток на фоне экспериментального дисбиоза. Экспериментальный дисбиоз индуцировали введением опытным мышам антибиотика доксицилина гидрохлорида (ОАО «Белмедпрепараты», Беларусь) в количестве 0,01% от массы тела в течение 7 дней.

Просветную микрофлору анализировали по 3 пробам асептически взятых фекальных масс от 5 мышей через 7 и 14 дней эксперимента. Состав микрофлоры кишечника опытных животных проводили по общепринятой методике [3]. Выделение бактерий из патологического материала и идентификацию штаммов проводили с использованием соответствующих стандартных дифференциально-диагностических сред (кровяной агар, агар Клиглера, среда Кларка, фенилаланиновый агар, МРС-4, среда Сабуро, среда Плоскирева, среда Симмонса, среда с лизином, среда Эндо, среда Блаурокка).

Факторы неспецифического иммунитета изучали путем определения уровня антителообразования в сыворотке крови мышей после их иммунизации. В эксперименте использовали 4 группы мышей-самцов линии NMRI массой 22-27 г по 6 особей в каждой. Мыши опытных групп вместо воды получали фукозу, растворенную в воде в концентрациях, обеспечивающих ежедневное потребление фукозы в количествах 40, 80 и 160 мкг/г массы тела, исходя из того факта, что мышь выпивает в среднем 2 мл воды в день. Раствор фукозы получали мыши опытных групп за 7 дней до первичной иммунизации и далее на протяжении 28 дней в течение всего эксперимента. Мыши контрольной группы получали только воду. В эксперименте использовали классическую схему иммунизации, при которой введение антигена проводилось с полным и неполным адьювантом в два этапа. Мыши были иммунизированы внутрибрюшинно карбоангидразой, выделенной из эритроцитов быка («AbD

Serotec», США), в количестве 50 мкг на особь. Первая иммунизация была проведена с полным адьювантом Фрейнда («Sigma», США), при этом объем смеси антиген-адьювант составлял 0,5 мл на одно животное. Вторая иммунизация проводилась через 14 дней после первой с неполным адьювантом Фрейнда («Sigma», США). Для определения вторичного иммунного ответа через 14 дней после вторичной иммунизации карбоангидразой производили декапитацию мышей и собранную кровь центрифугировали на малой скорости в течение 10 мин. В полученной сыворотке определяли концентрацию антител с помощью иммуноферментного анализа. В лунки 96-луночного планшета наносили антиген (карбоангидразу) по 10 мкг на лунку в 100 мкл 50 мМ карбонатного буфера (рН 9,6) и выдерживали в течение ночи при температуре 4 °С. После добавления блокирующего буфера (смесь 0,05% Твин 20, 5% сухого молока в фосфатно-солевом буфере) инкубировали в течение 1 часа при температуре 37 °С. Сыворотки крови разного разведения (от 1:100 до 1:50000) в количестве 100 мкл вносили в каждую лунку, после 3 часов инкубации добавляли по 100 мкл конъюгированных с биотином антител козы («StressGen Biotechnologies», Канада) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч. После инкубации с вторичными антителами в лунку вносили конъюгат стрептавидина с пероксидазой хрена («Имтек», Россия) и по 100 мкл зеленого красителя АВТС («Sigma», США) в 0,05 М цитратном буфере (рН 5,0) с 0,01% H_2O_2 и оставляли при комнатной температуре для развития окраски (10–40 мин). Для остановки реакции использовали 1,5 мМ NaN_3 в 50 мМ цитратном буфере (рН 5,0). Оптическую плотность измеряли при 405 нм на планшетном спектрофотометре Titertek Multiscan MCC/340 («Flow Laboratories», Финляндия).

Степень фукозилирования ооцитов определяли у 2 групп мышей-самок линии NMRI массой 22–27 г по 4 особи. Мыши опытной группы получали вместо воды раствор фукозы в концентрации, обеспечивающей ежедневное потребление фукозы в количестве 80 мкг/г массы тела, учитывая, что мышь выпивает в среднем 2 мл воды в день. Мыши получали фукозу в течение 30 дней перед выделением яйцеклеток. Затем у них вызывали суперовуляцию путем инъекции сыворотки жеребых кобыл подкожно в дозировке 0,2 мл/мышь, через 48 часов — хорионического гонадотропина внутривбрюшинно в дозировке 0,2 мл/мышь. Через 24 часа неоплодотворенные яйцеклетки выделяли промыванием яйцеводов физиологическим раствором и инкубировали в течение 1 часа в 0,3% растворе лектина *Ulex europaeus* («Sigma», США), конъюгированного с FITC (флуоресцин, максимум поглощения при $\lambda=494$ нм, максимум эмиссии при $\lambda=521$ нм). Яйцеклетки отмывали физиологическим раствором и микроскопировали на флуоресцентном микроскопе при длине волны $\lambda=494$ нм. Степень фукозилирования мембраны ооцита оценивали по интенсивности свечения. Математическую обработку полученных микрофотографий для оценки интенсивности свечения проводили с помощью пакета программ TLC-manager 4.0.1.

В работе представлены средние результаты серии экспериментов, достоверность которых обеспечивалась трехкратным и пятикратным повторением опытов с одновременным контролем ошибок измерения, обеспечивающим 95% точности по статистическим критериям. Полученные данные обрабатывали с использованием стандартных статистических методов с помощью критерия Стьюдента в программе «Statistica 9.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была исследована пребиотическая активность фукозы в опытах *in vivo* у опытных животных на фоне индуцированного дисбиоза. Исследование нормофлоры мышей показало наличие *Escherichia coli*, *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus acidophilus* в количестве 10^6 , 10^3 и 10^{10} КОЕ/см³ соответственно. После введения антибиотика в течение 7 дней у мышей наблюдалась элиминация нормальной микрофлоры и контаминация кишечника условно патогенной микрофлорой. Содержание *L. acidophilus* в фекалиях снизилось до 10^3 КОЕ/г, *B. bifidum* не обнаруживались совсем, а количество *E. coli* повысилось до 10^8 КОЕ/см³.

Результаты исследования микрофлоры мышей после коррекции экспериментального дисбиоза с помощью фукозы представлены в табл. Применение фукозы во всех испытанных дозах приводило к увеличению количества бифидобактерий и

молочнокислых бактерий уже на 7 сутки после введения, что свидетельствует о ее пребиотическом действии. Оптимальной концентрацией фукозы, достаточной для коррекции дисбиоза, можно считать 0,02% к массе тела опытных животных.

Фукоза является незаменимым углеводным компонентом иммуноглобулинов, выполняя роль терминального сахара в полисахаридной цепи гликопротеинов. Есть основания полагать, что при отсутствии в плазме крови минорных сахаров возможно нарушение синтеза углеводных цепей иммуноглобулинов, и соответственно, снижение их активности. Изучение влияния различных концентраций фукозы на процесс антителообразования у мышей показало, что количество антител в опытных группах, получавших фукозу в дозировке 80 мкг/г и 40 мкг/г, было выше по сравнению с контролем. Повышение дозировки фукозы до 160 мкг/г не приводило к статистически достоверному изменению уровня антителообразования относительно контроля. Включение фукозы в рацион опытных животных в дозировке 80 мкг/г массы тела обеспечивало самый высокий уровень антител в плазме крови у опытных мышей, а следовательно, приводило к положительному изменению их иммунного статуса.

Известно, что в состав гликопротеинов оболочки яйцеклетки входит значительное количество фукозы, которая непосредственно участвует в распознавании и адгезии сперматозоида, при ее недостатке могут возникать нарушения в процессе формирования яйцеклеток и их оплодотворения. Было исследовано влияние фукозы в рационе опытных мышей на процесс фукозилирования ооцитов. У мышей опытной группы наблюдалось увеличение интенсивности свечения яйцеклеток относительно контроля, что связано с большим количеством фукозы в оболочке ооцита. Яйцеклетки опытных мышей отличались большей степенью фукозилирования (53,2%), и в них наблюдалось более равномерное распределение молекул фукозы по поверхности ооцита, в то время как у контрольной группы животных (степень фукозилирования — 46,8%) отмечены неоднородности в структуре оболочек ооцитов. Для мышей опытной группы установлено увеличение доли способных к оплодотворению яйцеклеток с 25 до 75%, а также количества детенышей в помете в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой (9±1 и 6±1 соответственно). Таким образом, введение в рацион мышей фукозы в дозировке 80 мкг/г массы тела способствовало увеличению степени фукозилирования ооцитов, доли способных к оплодотворению яйцеклеток и увеличению количества детенышей в помете, что говорит о положительном влиянии фукозы на репродуктивную функцию млекопитающих.

На основании полученных результатов можно заключить, что фукоза способствует восстановлению состава и численности нормальной микрофлоры опытных животных, что говорит о ее пребиотическом действии; способность фукозы стимулировать повышение уровня антител свидетельствует об иммуноотропных свойствах углевода. Увеличение доли способных к оплодотворению яйцеклеток и степени фукозилирования ооцита при введении в рацион опытных животных фукозы косвенно свидетельствует о положительном влиянии фукозы на репродуктивную функцию опытных животных.

Работа выполнена в рамках гранта Российского научного фонда (проект № 17-76-10059).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ардатская М.Д., Бельмер С.В., Добрица В.П., Захаренко С.М., Лазебник Л.Б., Минушкин О.Н., Орешко Л.С., Ситкин С.И., Ткаченко Е.И., Суворов А.Н., Хавкин А.И., Шендеров Б.А. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015, 5 (117): 13-50.

Влияние фукозы на микрофлору мышей на фоне дисбактериоза

Микроорганизмы	Содержание микроорганизмов в пробах, КОЕ/г фекалий		
	Дозировка фукозы, % от массы тела опытных мышей		
	0,01	0,02	0,04
контрольное время — 7 суток			
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹⁰	10 ¹¹	10 ¹¹
контрольное время — 14 суток			
<i>E.coli lac⁺</i>	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10 ³	10 ³	10 ³
<i>Lactobacillus spp.</i>	10 ¹⁰	10 ¹¹	10 ¹¹

2. Санина Т.В., Кирьянова С.В., Черемушкина И.В., Корнеева О.С. Исследование бифидогенной активности фукозы и ее полимеров. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011, 1: 141-143.
3. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Микрофлора человека и животных и её функции. М., ГРАНТЬ, 1998.
4. Шендеров Б.А. Роль питания и кишечной микрофлоры в поддержании нутритивного гомеостаза человека. Вестник восстановительной медицины. 2008, 1: 12-13.
5. Inra J., Concetta V., Daniela de C. et al. Drosophila sperm surface alpha-L-fucosidase interacts with the egg coats through its core fucose residues. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 2015, 63: 133-143. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.06.011.
6. Listinsky J.J., Siegal G.P., Listinsky C.M. The emerging importance of alpha-L-fucose in human breast cancer: a review. *Am. J. Transl. Res.* 2011, 3 (4): 292-322.
7. Luther K.B. Role of unusual O-glycans in intercellular signaling. *International Journal of Biochemistry Cell Biology.* 2009, 41: 1011-1024.
8. Orczyk-Pawliłowicz M. The role of fucosylation of glycoconjugates in health and disease. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online).* 2007, 61: 240-252.
9. Park D., Ryu K.S., Choi D. et al. Characterization and role of fucosemutarotase in mammalian cells. *Glycobiology.* 2007, 17 (9): 955-962.
10. Romero-Aguirregomezcorta J., Mat6s C., Coy P. α -L-fucosidase enhances capacitation-associated events in porcine spermatozoa. *Vet. J.* 2015, 203 (1): 109-114. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.11.006.
11. Venditti J.J., Swann J.M., Bean B.S. Hamster sperm-associated alpha-L-fucosidase functions during fertilization. *Biol. Reprod.* 2010, 82 (3): 572-579. doi: 10.1095/biolreprod.109.076695.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

А.С.Оксанич, А.А.Никонова, В.В.Зверев

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИТЕЛА В ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

НИИ вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова, Москва

За последние 20 лет было разработано более 60 рекомбинантных моноклональных антител (МкАт) для лечения различных заболеваний. Более 30 препаратов антител разрешены к применению в терапии, включая большую группу препаратов против онкологических заболеваний. Также МкАт используют в трансплантологии, для лечения сердечно-сосудистых, аутоиммунных и, в редких случаях, инфекционных заболеваний. Несмотря на то, что от вирусных заболеваний ежегодно гибнут десятки миллионов людей, в настоящее время разрешен всего один препарат на основе рекомбинантных антител для профилактики РСВ у детей. В обзоре основное внимание уделяется подходам к созданию терапевтических МкАт против вирусных инфекций, примерам терапии вирусных инфекций рекомбинантными антителами и проблемам разработки таких методов лечения.

Журн. микробиол., 2018, № 6, С. 114—123

Ключевые слова: рекомбинантные антитела, вирусные инфекции, иммуноглобулин, терапия

А.С.Оксанич, А.А.Никонова, В.В.Зверев

RECOMBINANT ANTIBODIES IN ANTI-VIRAL THERAPY: ACHIEVEMENTS AND PERSPECTIVES

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

More than 60 recombinant monoclonal antibodies (mAbs) have been developed for the treatment of various diseases in the last 20 years. About 30 antibody preparations are approved for use in therapy, including large group of drugs against cancer. In addition, mAbs are used in transplantation, for the treatment of cardiovascular, autoimmune and, in rare cases, infectious diseases. Despite the fact that tens millions of people die every year from viral diseases, only one drug based on recombinant antibodies for the prevention of RSV in children is currently allowed. This review focuses on approaches to generate therapeutic mAbs to fight viral infection, examples of mAb therapies for viral infections, and the challenges of developing such therapies.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 6, P. 114—123

Key words: recombinant antibodies, viral infections, immunoglobulin, therapy