

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ ИМ. В. А.  
ЭНГЕЛЬГАРДТА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



На правах рукописи

ГЕНЕРАЛОВ ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**БИОФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ  
С РЕЦЕПТОРАМИ DECTIN-1 И TLR-6 ПРИРОДНЫХ  
ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ *HELIANTHUS TUBEROSUS L.***

Специальность 03.01.02 – биофизика, 03.01.08 – биоинженерия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

7 МАЯ 2017



008711812

Москва - 2017

Работа выполнена в лаборатории пролиферации клеток Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им.  
В.А. Энгельгардта Российской академии наук, г. Москва.

Научный руководитель: **Чумаков Петр Михайлович**

доктор биологических наук, профессор, заведующий  
Лабораторией пролиферации клеток ИМБ РАН

Научный руководитель **Яковенко Леонид Владимирович**

доктор физико-математических наук, профессор кафедры  
биофизики физического факультета МГУ имени М.В.  
Ломоносова

Официальные оппоненты: **Наптелеев Михаил Александрович**

доктор физико-математических наук, заведующий  
Лабораторией молекулярных механизмов гемостаза  
ЦТПФХФ РАН

**Клечковская Вера Всееводовна**

доктор физико-математических наук, профессор, заведующая  
Лабораторией электронографии ИК РАН

**Быстров Владимир Сергеевич**

доктор физико-математических наук, ведущий научный  
сотрудник, руководитель Группы компьютерного  
моделирования молекулярныхnanoструктур и биосистем  
ИМПБ РАН - филиала ИПМ им. М.В. Келдыша РАН

Зашита диссертации состоится «16» ноября 2017 г. в 17-00 часов на заседании  
диссертационного совета МГУ.01.04 Московского государственного университета имени  
М.В. Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, Дом 1, строение 2,  
Физический Факультет.

E-mail: info@physics.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки  
МГУ им. М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»:  
[https://istina.msu.ru/dissertation\\_councils/councils/28357490/](https://istina.msu.ru/dissertation_councils/councils/28357490/)

Автореферат разослан «13» ноябрь 2017 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат технических наук

А. Э. Сидорова

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность темы и степень ее разработанности**

Гликаны являются универсальным и необходимым компонентами жизни. Они имеют размеры от одного моносахарида до полисахаридов длиной в тысячу единиц и обнаружаются в больших структурных полисахаридах, секрецируемых компонентах слизи или в составе белковых и липидных коньюгатов [Ju et al., 2001; Wennekes et al., 2009; Somerville, 2006]. Сахара покрывают клетки каждого организма и представляют собой широкий класс органических молекул на Земле [Weinbaum et al., 2007]. Структуры моносахаридов впервые установлены Фишером в середине 1880-х годов [Fischer et al., 1909], но прошло почти столетие, прежде чем ученые начали понимать сложные функции этих молекул в биологии [Bertozzi et al., 2001]. Отставание в понимании структуры и функции гликанов связано со сложностью, присущей регуляции и сборке этих биомолекул. Гликаны непосредственно не кодируются геномом и, таким образом, их биосинтез и структура диктуется метаболизмом, передачей сигналов и метаболическим статусом клетки [Dennis et al., 2009; Parker et al., 2010]. Кроме того, для них характерна конформационная изомерия [Cummings, 2009; Muthana et al., 2012].

В настоящее время человечество всё чаще сталкивается со следующим рядом проблем: снижение иммунного статуса человека, рост числа заболеваний вирусной этиологии и онкологических заболеваний и появление новых типов вирусов и заболеваний, возникновение у патологических микроорганизмов толерантности к антибактериальным препаратам, рост радиационного фона, загрязнение окружающей среды и многое другое. В связи с этим все более актуальными становятся меры защиты организма от лучевых поражений и восстановления клеточного баланса различных органов и тканей, для чего необходимо создание нетоксичных радиозащитных и регенерационных препаратов. Перспективным подходом в этом направлении является поиск полисахаридов, обладающих необходимой активностью.

В настоящее время хорошо известно, что гликаны играют важную роль в самых разнообразных биологических событиях, включая клеточную адгезию и миграцию, развитие организма, прогрессирование заболевания и модуляцию иммунологических реакций [van Kooyk et al., 2008; Ohtsubo et al., 2006].

В последние годы исследования подтвердили, что полисахариды из натуральных продуктов обладают разнообразными полезными терапевтическими эффектами и способствуют укреплению здоровья людей. В частности, морские водоросли, и полученные из них полисахариды, такие как альгинат, фукоидан, каррагинан, ламинаран и агар [Laurienzo et al., 2012], широко применяются для биомедицинских и биологических

целей [Venkatesan et al., 2015; Valente et al., 2012; Silva et al., 2012; Popa et al., 2014], например, для тканевой инженерии, доставки лекарств, заживления ран и создания биосенсоров.

Одним из источников углеводов, разнообразных по структуре и обладающих широким спектром биологических активностей, является *Helianthus tuberosus L.*. Изучение физико-химических свойств, биологических активностей и молекулярных механизмов действия этих полисахаридов, а также освоение способов их применения на практике может дать возможность создавать новые лекарственные средства.

До последнего времени полисахариды из *Helianthus tuberosus L.* их структурно-функциональные характеристики, а также рецепторы, взаимодействующие с полисахаридами, были слабо изучены. В ходе данной работы был выделен и охарактеризован новый биологически активный полисахарид из *Helianthus tuberosus L.* Для изучения взаимодействия с клеточными рецепторами полисахаридов из *Helianthus tuberosus L.* использовался современный подход в гликохимии – выключение генов. Полисахариды из *Helianthus tuberosus L.* обладают иммуномодулирующим, противоопухолевым, радиопротекторным действием и являются нетоксичными природными биополимерами, что может обеспечить их широкое применение в таких областях, как фармакология, ветеринария и медицина.

#### **Цель диссертационной работы**

Целью исследования является определение молекулярных механизмов биологической активности природных полисахаридов из *Helianthus tuberosus L.*

#### **Задачи диссертационной работы**

Выделение и очистка полисахарида из *Helianthus tuberosus L.* (HTLP) методами гельпроникающей хроматографии, ультра- и тангенциальной фильтрации.

Определение физико-химических характеристик полученного полисахарида, таких как тип гликозидной связи, спектральные характеристики (инфракрасный спектр, ультрафиолетовый спектр, ЯМР-спектр), моносахаридный состав, молекулярная масса.

Изучение биологической активности выделенного полисахарида в противовирусной, противораковой, иммуномодулирующей и радиопротекторной моделях.

Отработка подходов для изучения рецепторного взаимодействия и определение возможных молекулярных механизмов действия полисахарида из *Helianthus tuberosus L.*

Построение биофизической модели для описания переключения состояния клетки при взаимодействии полисахарида с рецепторами Dectin-1 и TLR-6 с точки зрения бифуркационного подхода.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Полисахарид из *Helianthus tuberosus L.* обладает биологической активностью, которая проявляется в моделях: противораковой, радиозащитной, колониестимулирующей, противовирусной и иммуномодулирующей.
2. Полисахарид из *Helianthus tuberosus L.* обладает разветвленным строением, с боковыми цепями с  $\beta$ -(1→4) и  $\beta$ -(1→3)-гликозидными связями, которые определяют биологическую активность; относится к классу гетерогликанов и содержит 0,5% белка.
3. Биологическое действие полисахарида обусловлено взаимодействием HTLP с рецепторами Dectin-1, TLR-6 и активации их внутриклеточных каскадов.
4. В результате применения полисахарида из *Helianthus tuberosus L.* происходит запуск иммунологических процессов на клеточном и организменном уровнях.
5. Предложенная модель бифуркационных переключений в клетке, вызванных взаимодействиями полисахарида из *Helianthus tuberosus L.* с рецепторами Dectin-1 и TLR-6, может быть использована в качестве основы для интерпретации экспериментальных данных.

### **Научная новизна диссертационной работы**

Впервые получен биологически активный высокоочищенный полисахарид из *Helianthus tuberosus L.* на основе глюкозы, галактозы и уроновых кислот. Установлено, что его биологическое действие зависит от наличия  $\beta$ -глюкановой части в составе гетерополисахарида.

Впервые определены биофизические характеристики HTLP;

в ИК-спектре присутствуют характерные для полисахаридов полосы поглощения; полоса в области 1148  $\text{cm}^{-1}$  и характерны для  $\beta$ -гликанов;

в УФ-спектре присутствует пик поглощения в области 280 нм, характерный для белков. Определение количества белка методом Лоури показало содержание до 0,5% белка, что было подтверждено и другими методами исследования;

полисахарид имеет молекулярную массу 1–2 МДа со следующим моносахаридным составом: Glc – 30%, GalA – 23%, GlcA – 15%, Gal – 13%, Rha – 6%, Ara – 4%, Man – 3%, Xyl – 2%;

по данным ЯМР-анализа структура HTLP сильно разветвлена и характеризуется наличием вставок экспонированных наружу  $\beta$ -глюканов, обеспечивающих связывание с рецепторами, а также  $\beta$ -(1→3), так и  $\beta$ -(1→4) связей, критичных для проявления биологических активностей.

В результате исследований биологической активности установлено:

полисахарид является истоксичным и не аллергичным протектором, интерферониндуцирующим агентом, способен стимулировать выработку TNF- $\alpha$  и IL-6, а также регулировать уровень IL-1;

при внутривенном введении полисахарида выживаемость подопытных мышей при летальном кратковременном лучевом воздействии в 800 рад составляла до 95%;

полисахарид является колониестимулирующим веществом, что установлено в teste на колонисобразующие единицы в селезенке (КОЕ-С) – колонисобразование спленоцитов во всех подопытных группах выросло в 2,0–2,3 раза по сравнению с контрольной группой;

применение полисахарида в модели герпетического менингозицерталита у мышей приводило к выраженному профилактическому или терапевтическому действию как в сравнении с контролем, так и в сравнении с фармакопейным препаратом – ацикловиром. При дозе вируса 10ЛД50 защитный эффект составлял 50–60%, а с ацикловиром – 15%; а при дозе 100ЛД50 – 57–63% при отсутствии эффекта у ацикловира;

обнаружено влияние НТLP на НК клетки в виде стимуляции и увеличения цитотоксического индекса на 15% по сравнению с контролем;

установлено, что полисахарид проявлял свои противоопухолевые свойства и в антиметастатической модели, и в модели торможения роста опухоли.

В экспериментах по инактивации целевых рецепторов показано, что полисахарид активирует клетки опосредованно, через взаимодействие с рецепторами Dectin-1, TLR-6.

Установлено, что оба рецептора необходимы для активации клеток с помощью НТLP, что подтверждается экспериментальными данными двух моделей: блокировки рецепторов антителами и инактивации генов целевых рецепторов.

Моделирование показало возможность возникновения в трансформированной клетке бифуркационного состояния выбора между апоптозом и пролиферацией, которое обусловлено взаимодействием полисахарида с рецепторами клетки Dectin-1 и TLR-6.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты исследований позволяют включить биологически активный полисахарид из *Helianthus tuberosus L.* в группу уже охарактеризованных полисахаридов, выделенных из различных источников. Разработана методика получения из растительного сырья полисахаридного препарата с противометастатической, противовирусной, радиопротекторной, колониестимулирующей и иммуномодулирующей активностями.

Модель бифуркационного изменения состояния трансформированной клетки и полученные новые данные о полисахаридах из *Helianthus tuberosus L.* могут быть

использованы для создания и тестирования *in silico* на их основе новых лечебных и профилактических препаратов для медицины и ветеринарии.

**Личный вклад** автора состоял в планировании и проведении экспериментов, а также в анализе полученных данных, выборе и формулировании темы докторской диссертации, подготовке публикаций и выступлений. Все изложенные в докторской диссертации новые результаты получены автором лично или при его непосредственном участии в подготовке экспериментов.

**Апробация результатов.** Материалы докторской диссертации докладывались на IV Международной междисциплинарной конференции «Современные проблемы системной регуляции физиологических функций» (г. Москва, 2015 г.) и VIII Международной Научной Конференции SCIENCE4HEALTH2017 (г. Москва, 2017 г.).

#### **Степень достоверности и апробации результатов**

По теме докторской диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 7 статей, из которых 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, 2 тезисов и 1 монография.

#### **Структура и объем работы**

Докторская диссертация состоит из введения, трех глав, обсуждения, выводов и списка литературы. Объем докторской диссертации составляет 192 страницы текста, включая 26 рисунков и 28 таблиц. Список использованной литературы содержит 308 наименований.

### **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Введение** представляет собой общую характеристику темы работы, обоснование актуальности, определение цели и задач докторского исследования, положений, выносимых на защиту, научной новизны, практической и теоретической значимости, а также описание методологии и методов исследования.

**Обзор литературы** состоит из четырех подразделов, описывающих углеводы и их место в живой природе. В первом разделе приведена общая характеристика, классификация и строение углеводов. Во втором разделе описаны различные функции и биологическая активность – иммуномодулирующая, противоопухолевая, антиоксидантная, обнаруженные к настоящему времени у полисахаридов: глюканов, гликанов, пектиновых и арабиногалактановых полисахаридов, гиалуронанов. В третьем разделе изложен современный взгляд на проблему взаимосвязи физико-химических и

структурных характеристик полисахаридных молекул с их биологической активностью. В четвертом разделе представлены характеристики клеточных рецепторов, взаимодействующих с полисахаридными молекулами или их фрагментами, в том числе семейств рецепторов: TLR, NLR, SR, LacCer, CR и CTLR, а также краткое описание сигнальных каскадов, ассоциированных с ними.

#### Материалы и методы

Для выделения полисахаридов с молекулярной массой 1–2 МДа и их анализа был использован сорт *Helianthus tuberosus L.* Все использованные клеточные культуры были получены в ФГБУН ИМБ им. В.А. Энгельгардта. Лабораторные животные, использованные в экспериментах, были приобретены в питомнике «Андреевка» ГУ ИЦ биомедицинских технологий РАМН.

Полисахарид выделяли из клубней *Helianthus tuberosus L.*

Количественное определение карбогидратов проводили фенопсернокислотным методом Дюбуа [Dubois, 1956]. Для измерения количества белка в составе полисахарида использовался метод Лоурн [Lowry, 1951].

Фракцию с диапазоном молекулярных масс больше 300 кДа после ультрафильтрации растворяли в дистиллированной воде, центрифугировали и разделяли на анионообменнике DEAE 650 S TSK. Элюцию проводили водой и растворами KCl. Для работы отбирали фракции по качественной реакции с фенопсерной кислотой. Полученные фракции обессоливали и концентрировали тангенциальной ультрафильтрацией, лиофильно высушивали и тестировали на наличие активности. Для разделения по молекулярным массам использовали эксклюзационную жидкостную хроматографию.

Фракцию, полученную с использованием раствора 0,5 М KCl, после ионообменника DEAE 650 S TSK разделяли с использованием колонки XK 50/100 с Toyopearl HW-75. Оценивали молекулярную массу полисахарида с использованием дексстранов Т-серии и голубого дексстрана с молекулярной массой 1–2 МДа.

Молекулярную массу и гомогенность HTLP определяли также с помощью Prominence Series HPLC system с фотодиодным детектором и колонкой TSKG6000PW. Контроль выхода полисахаридов проводили методом Дюбуа. Фракции различных пиков объединяли, дialisировали и лиофильно высушивали. Все работы по изучению структурных характеристик и биологической активности проводили с фракций, прошедшей все этапы очистки и названной HTLP.

УФ-спектры поглощения HTLP регистрировали на спектрофотометре UV-1800 Shimadzu. Спектры снимали в диапазоне длии воли 190–1100 нм.

Для снятия ИК-спектров использовался прибор IRAffinity-1 FTIR System с ATR MIRacle-10. Разложение контура полос в спектре делали с использованием пакета ACD/Labs/Spectrus. Спектры регистрировались в диапазоне от 4000 до 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Для ЯМР-анализа использовался ЯМР-спектрометр Bruker Avance 400. 1 мг вещества растворяли в 0,5 мл  $\text{D}_2\text{O}$ . Моделирование возможной структуры полисахарида проводили с использованием программ CASPER и NMRgraph.

Для определения моносахаридного состава проводили кислотный гидролиз. Конечные гидролизаты анализировали на хроматографе Prominence Series HPLC.

Тип гликозидной связи определяли путем обработки полисахаридных растворов литиказой из *Arthrobacter Luteus*, а также целлюлазой из *Aspergillus niger* в соответствии с методикой Стоуна и Кларка [Stone et al., 1992]. После чего проверяли активность в модели стимуляции антителообразующих клеток (АОК).

Пирогенность HTLP проверялась на здоровых кроликах обоего пола. Раствор, содержащий полисахарид и 0,9% NaCl, вводился в ушную вену.

Стимуляцию АОК клеток исследовали на мышах F<sub>1</sub>(CBAxC<sub>57</sub>Bl/6). В качестве антигена для иммунизации применяли дефибринированные эритроциты барана (ЭБ). ЭБ вводили внутрибрюшинно. Уровень иммунного ответа у мышей, иммунизированных ЭБ, определяли по количеству АОК, выявляемых в селезенке методом Ерне [Jerne et al., 1963].

Оценка цитотоксичности HTLP проводилась на линии клеток RAW 264.7. Оценка жизнеспособности клеток проводилось через 24 часа после добавления HTLP путем окрашивания культур клеток пропидий иодидом и бис-бензимидом с целью обнаружения ядер погибших клеток и общего количества клеток в культуре соответственно. Визуализация окрашивания проводилась с помощью инвертированного.

Оценку токсичности HTLP проводили спектрофотометрически после редукции (3,4,5-диметилтиазол-2-иль)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) бромида в формазановый пигмент под влиянием внутриклеточных дегидрогеназ.

Влияние HTLP на количество клеток линии RAW 264.7 оценивали через 4 и 24 часа инкубирования макрофагов с HTLP. Осуществляли подсчет клеток с помощью ручного автоматического цитометра Septier.

Иммуномодулирующую активность проверяли в нескольких экспериментах – модулировании уровней цитокинов IL-1, IL-6, TNF, IFN. Активность TNF в надосадочных жидкостях определяли методом Рафф и Гилфорд [Ruff et al., 1981] на клетках L-929. Контролем служили клетки, инкубированные с LPS. Вторым способом оценки влияния полисахарида на выработку фактора некроза опухолей было определение экспрессии

генов TNF- $\alpha$  на макрофагальной клеточной линии RAW 264.7 методом иммуноферментного анализа с помощью набора Mouse TNF alpha Elisa Ready-SET-Go!.

Для инактивации генов целевых рецепторов методом РНК-интерференции были использованы синтезированные олигонуклеотидные последовательности, комплементарные фрагментам целевых рецепторов – Dectin-1, TLR-6, CR3. Для получения рекомбинантного лентивируса использовали клетки HEK293T, которые котрансфицировались плазмидами pRSV-Rev, pMDLg/pRRE (ген/вставка HIV-1 GAG/POL), pCerulean-VSVG и плазмидой, несущей shRNA гена интереса. Проводили заражение и селекцию клеток RAW 264.7. Проверка выключения рецепторов велась по свечению метки в генном конструкте RFP, GFP и BFP.

Блокировка целевых рецепторов проводилась антителами с концентрациями: CR3, TLR-6 и Dectin-1. В дальнейшем клетки активировали LPS и HTLP и тестировали выработку TNF- $\alpha$  с использованием 96-луночного планшетного ридера.

Для оценки противовирусной активности полисахарида использовали экспериментальную модель герпетического менингоэнцефалита мышей. Использовали ВПГ-1 штамм Клейман. Титр вируса определяли на модели фибробластов эмбрионов кур и культуре клеток Vero. Белых мышей BALB/c инфицировали вирусом Клеймана внутрибрюшинно. Референц-препаратором был выбран ацикловир. Раствор полисахарида вводили мышам в хвостовую вену.

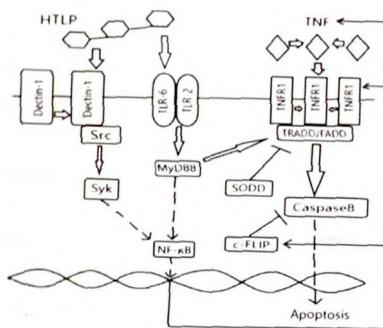
Для изучения противораковой активности *in vitro* использовали линии клеток карциносаркомы гортани человека Нер-2 и мышиной анесуплондной фибросаркомы L-929. Противораковую активность оценивали подсчетом видимых раковых клеток, окрашенных трипановым синим, в сравнении с контрольными культурами. Исследование *in vivo* активности противораковых свойств полисахарида из *Helianthus tuberosus L.* и воздействия на метастазы проводили на карциносаркome Уокера. Использовались самцы и самки крыс породы «Август». Антиметастатическую активность HTLP изучали на экспериментальной модели карциномы легких Льюиса.

Для оценки радиопротекторной активности фракции полисахарида использовали экспериментальные модели абсолютной выживаемости и выживаемости гемопоэтических стволовых клеток.

Принципиальная схема модели передачи внутриклеточного сигнала при связывании полисахарида с рецепторами и формированием петли обратной связи с участием TNF и TNFR1 представлена на рисунке 1.

В нормальном состоянии клетки уровень проапоптотического сигнала низок, вероятность перехода в предапоптотическое состояние мала, и клетка выживает, несмотря

на присутствие HTLP. В трансформированной клетке ситуация другая. При воздействии HTLP проапоптотический сигнал может превысить некий пороговый уровень, и происходит бифуркация: состояние клетки становится неустойчивым, и с большой вероятностью она может перейти не только в предапоптотическое состояние, но и к апоптозу. В связи с этим представляется возможным описание такого бифуркационного поведения клетки с помощью всего двух переменных, выбранных специальным образом.



**Рисунок 1.** Принципиальная схема формирования регуляторных сигналов в клетке при взаимодействии HTLP с рецепторами Dectin-1 и TLR-6.

Все реакции в регуляторных путях происходят самопроизвольно (имеются в виду не элементарные, а суммарные реакции, связанные с переносом сигнала между узлами регуляторной сети.), т.е. с понижением энергии Гиббса системы, поэтому клетку можно рассматривать как активную среду. В качестве обобщенной координаты  $x$  будем использовать некую условную функцию состояния графа реакций в регуляторной сети, такую, что для реакций на клеточной мемbrane она равна нулю, а в «геноме» – единице. Две переменные, описывающие поведение клетки, зависят от координаты и времени и соответствуют вероятностям формирования сигналов для выбора проапоптотического или противоапоптотического пути. Поскольку узлов в графе реакций много, перенос сигнала по обобщенной координате можно описать как диффузию [246]. В дальнейшем под диффузией понимается именно такой перенос сигнала.

Для описания поведения клетки предлагается использовать модифицированную систему уравнений ФитцХью-Нагумо [247]:

$$\begin{aligned} \varepsilon^2 \frac{\partial u}{\partial t} - \varepsilon^2 D_u \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} &= -u(u-\alpha)(u-1) + \gamma uv, \\ \frac{\partial v}{\partial t} - \varepsilon^2 D_v \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} &= -\gamma v + \beta(t)u, \end{aligned}$$

сходную с использованной ранее при моделировании структурообразования в урбоэкосистемах [248]. Система решается численно, при этом на границах области расчета задаются краевые условия Неймана.

Безразмерные переменные  $u$  и  $v$  соответствуют вероятностям формирования про- («активатор») и противоапоптотического («ингибитор») сигнала (можно говорить и об интенсивностях соответствующих сигналов). Параметры  $D_u$  и  $D_v$  – безразмерные коэффициенты диффузии,  $\beta(t) > 0$  – кинетический параметр взаимодействия активатора и ингибитора,  $\alpha$  – параметр активации системы,  $\gamma$  – кинетический параметр затухания противоапоптотического сигнала,  $\varepsilon$  – кинетический параметр, позволяющий учесть различие в скоростях распространения про- и противоапоптотического сигнала. Более подробное описание параметров и их численные значения приведены в тексте диссертации.

## Результаты

Из грубой вытяжки *Helianthus tuberosus L.* была экстрагирована полисахаридная фракция. Дальнейшая экстракция, очистка и ультрафильтрация позволили увеличить степень чистоты и гомогенности фракции полисахаридов, а полученный острый пик на хроматограмме ЖХВД, последнего этапа очистки – полисахарид HTLP (рисунок 2). По оси  $y$  – относительные единицы поглощения.

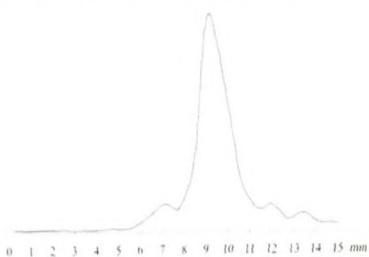


Рисунок 2. ВЭЖХ-ГПХ выделения фракции полисахаридов HTLP. Детекция – по поглощению при длине волны 220 нм. На оси ординат отложены относительные единицы поглощения, на оси абсцисс – минуты.

## Физико-химические характеристики HTLP

Спектральные характеристики.

В УФ-спектре присутствует максимум в области 190–210 нм, характерный для полисахаридов и небольшой максимум в области 280 нм, характерный для белков (рисунок 3).

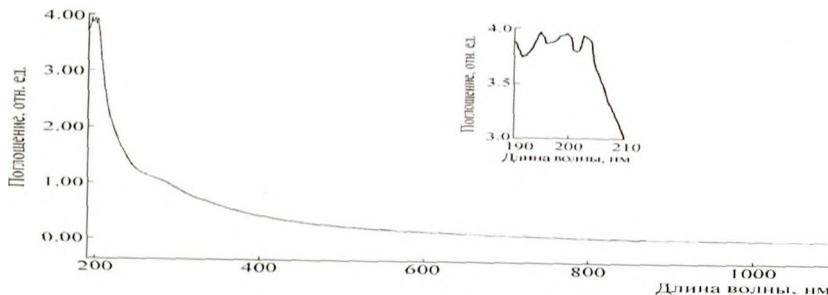
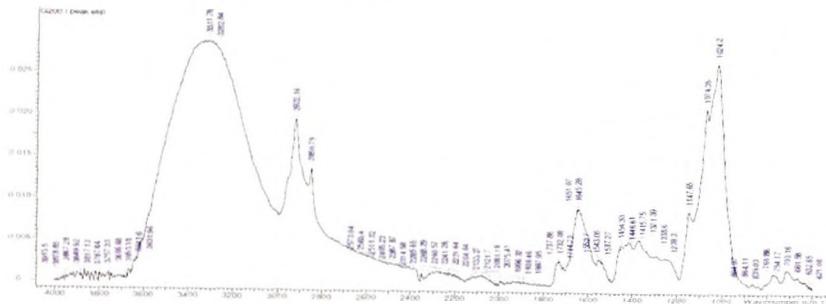


Рисунок 3. Характерный УФ-спектр HTLP.

В ИК-спектре HTLP (рисунок 4) отмечаются полосы поглощения около  $1740\text{ cm}^{-1}$ , которые соответствуют карбоксильной группе, указывающей на присутствие уроновых кислот в HTLP, а сильные поглощения на  $1074$  и  $1024\text{ cm}^{-1}$  и среднее поглощение на  $1148\text{ cm}^{-1}$ , при наличии колебаний пиранозного кольца, означают наличие структуры, присущей  $\beta$ -глюкану. Таким образом, ИК-спектр HTLP имеет характерные для полисахаридных структур полосы поглощения.



$^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры позволили смоделировать предположительную структуру полисахарида с использованием программного обеспечения CASPER и NMRgraph. Моносахаридный состав HTLP. Методом ВЭЖХ было получено, что полисахарид HTLP имеет следующий моносахаридный состав: Glc – 30%, GalA – 23%, GlcA – 15%, Gal – 13%, Rha – 6%, Ara – 4%, Man – 3%, Xyl – 2%.

Совместная обработка ферментами литиказой из *Arthrobacter Luteus* и целлюлазой из *Aspergillus niger* приводила к практически полной потере биологической активности полисахаридной фракции в модели стимуляции продукции АОК.

#### Биологическая активность

Стимуляция антителообразующих клеток (АОК) в селезенках мышей после совместного введения HTLP с эритроцитами барана (ЭБ). В эксперименте была выявлена стимуляция образования антител к ЭБ в клетках селезенок мышей (таблица 1).

Таблица 1. Стимуляция антителообразующих клеток в селезенках мышей после совместного введения HTLP и  $2 \times 10^6$  ЭБ.

Образец, мкг/мышь	1	10	100	1000	Контроль
АОК	$200 \pm 16$	$502 \pm 75$	$743 \pm 80$	$927 \pm 94$	$47 \pm 6$
Kc,*	4,3	10,7	15,8	19,7	-

\* - отношение числа АОК в опыте к числу АОК в контроле

После обработки HTLP ферментами липазой и целлюлазой его адьювантная активность практически полностью исчезала. Так, например, полисахаридный гидролизат после обработки липазой (100 мкг/мышь) показал стимуляцию АОК до  $68 \pm 7$ , а контроль –  $65 \pm 7$ . После аналогичной обработки HTLP целлюлазой (100 мкг/мышь) стимуляция АОК составляла  $104 \pm 9$  против  $83 \pm 9$  в контроле.

#### *Оценка цитотоксического действия HTLP на клетки линии RAW 264.7.*

При добавлении полисахарида (200 мкг/мл) в культуру клеток процент мертвых клеток составил  $2,99 \pm 0,54\%$ , а в контроле –  $2,76 \pm 0,25\%$ , что свидетельствует об отсутствии цитотоксичности у полисахарида HTLP.

#### *Определение MTT-редуктазной активности при исследовании токсичности HTLP на клетках линии RAW 264.7.*

Культивирование клеток линии RAW 264.7 24 часа с 200 мкг/мл HTLP не приводило к достоверному увеличению процента мертвых или живых клеток в культурах клеток линии RAW 264.7 в модели по определению MTT-редуктазной активности и окрашиванию культур клеток пропидий иодидом.

Влияние HTLP на продукцию TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 в культуре мононуклеарных клеток человека (МНК). Уровень продукции TNF мононуклеарами оказался сходным у различных доноров после 12-часовой инкубации с HTLP. Сравнительно с контрольными и LPS-индуцированными культурами добавление HTLP приводило к стимуляции продукции TNF у всех доноров до 8,4 раз. Выработка IL-1 была изучена на МНК, выделенных от трех доноров, которые различались по начальному уровню продукции IL-1 без добавления и с добавлением LPS. При высокой продукции IL-1 (как спонтанной, так и LPS-индуцированной) внесение полисахарида HTLP в клеточные культуры доноров влекло за собой снижение количества, высвобождаемого IL-1 (донор 1 и 3). Напротив, при

низкой продукции цитокина (донор 2) наблюдалась стимуляция высвобождения IL-1. При воздействии полисахарида на культуры МПК доноров подавлялся высокий уровень продукции IL-1 и стимулировался низкий уровень LPS-индуцированной продукции IL-1.

Внесение полисахарида в клеточные культуры доноров приводило к стимуляции выработки IL-6. Однако можно было наблюдать индивидуальные различия стимуляции продукции IL-6 в зависимости от доз углевода. Малые концентрации полисахарида (1–3 мкг/мл) у двух доноров – 2 и 3 – стимулировали выработку LPS-индуцированного IL-6. Подобная стимуляция наблюдалась после внесения в клеточную культуру МПК донора 3 углевода в пределах диапазона доз 10–30 мкг/мл. Стимуляция продукции IL-6 в культурах МПК, не обработанных LPS, происходила только при добавлении к ним относительно высоких доз полисахарида (доноры 1 и 2).

Индукция интерферона *in vivo* и *in vitro*. Максимальная продукция сывороточного IFN через 6 часов после введения раствора полисахарида достигала 256 МЕ/мл, тогда как госсинопол индуцировал 8–16 МЕ/мл IFN. Таким образом, титры IFN, синтезированного у мышей в ответ на введение полисахарида, в 16–32 раза превышали уровень IFN в ответ на введение стандартного индуктора интерферона госсинопола.

Стимуляция активности натуральных киллеров. Индекс цитотоксичности для модели с добавлением лимфоцитов периферической крови (ЛПК) составил  $61 \pm 3$ , а при добавлении ЛПК совместно с полисахаридом –  $78 \pm 3$ . При этом добавление только полисахарида не приводило к сильной цитотоксичности и индекс составил  $4 \pm 1$ . Таким образом, полисахарид усиливает активность натуральных киллеров *in vitro*, но при этом не является цитотоксическим агентом.

#### *Противовирусная активность*

Полисахарид обладает ярко выраженным протективным и терапевтическим (противовирусным) действием. Выживаемость мышей составила 80% и 70% при однократном введении HTLP за 5 дней и двукратном – за 5 дней и через 3 часа после инфицирования 10ЛД<sub>50</sub>, а при 100ЛД<sub>50</sub> – 57% и 63%, соответственно. При этом в контроле выживаемость составила 17%, что меньше в 3,4 и 3,7 раза, чем в опытных группах. При дозе вириуса 10ЛД<sub>50</sub> защитный эффект HTLP колебался в интервале 53–63% в сравнении с 15% у ацикловира; а при дозе 100ЛД<sub>50</sub> – 57–63% при отсутствии эффекта у ацикловира и полном вымирании контроля. Средняя продолжительность жизни выросла в опытных группах HTLP и при 10ЛД<sub>50</sub>, и при 100ЛД<sub>50</sub> с HTLP – почти в 3 раза.

#### *Противоопухолевая активность in vitro*

HTLP вызывал торможение роста опухолевых клеточных линий, при этом максимальное значение достигалось при 200 мкг/мл: около 81% для L-929 и 40% – Нер-2.

Такое торможение роста культуры клеток связано, скорее всего, с запуском проапоптотических каскадов в трансформированных клетках, поскольку HTLP не обладает прямым цитотоксическим действием, что было показано в одном из экспериментов. Антиметастатическая активность HTLP показана в экспериментальной модели карциносаркомы Уокера *in vivo*, при этом максимальное ингибирование числа опухолевых клонов составило около 37% при ежедневном введении HTLP.

В экспериментальной модели карциномы легких Льонса *in vivo* торможение роста опухоли достигало 15%. Другой важный показатель онкологического процесса – образование метастазов в легкие. Наибольшее торможение процесса метастазирования, около 40%, наблюдалось к 20-ым суткам в группе животных, получавшей 0,5 мг/кг пятикратно. В то же время данные прямого подсчета количества метастазов в легочной ткани контрольных и опытных животных позволяют установить, что однократное введение полисахарида в дозах 25 и 5 мг/кг тормозит процесс метастазирования на 60 и 75%, соответственно, по сравнению с контролем. Отчетливый антиметастатический эффект прослеживается и в более поздние сроки развития процесса. На 17-ые сутки роста опухоли антиметастатический эффект наблюдается во всех группах животных. Ингибирующий эффект выражается в зависимости от дозы в пределах 30–50%. Торможение процесса метастазирования к 20-ым суткам составляет 50–75%.

#### *Экспериментальная модель выживаемости гемопоэтических стволовых клеток*

В модели определения количества КОЕ-С в подопытных группах образуется в 2,0–2,3 раза больше колоний силеноцитов, чем в контрольной группе. Это свидетельствует о наличии у исследуемого полисахарида способности защищать гемопоэтические стволовые клетки от действия ионизирующего излучения.

#### *Экспериментальная модель абсолютной выживаемости*

HTLP обладает радиопротекторными свойствами. Максимальная выживаемость при облучении в дозе 800 рад составила 95% при введении HTLP через 6 часов после экспозиции в дозе 100 мкг/животное, что выше контрольных значений почти в 4,8 раза, а минимальная – 65%, что выше контрольных значений почти в 3,3 раза. Для дозы 850 рад значения составили – 40% и 0%, соответственно, в контроле – 0% (таблица 2).

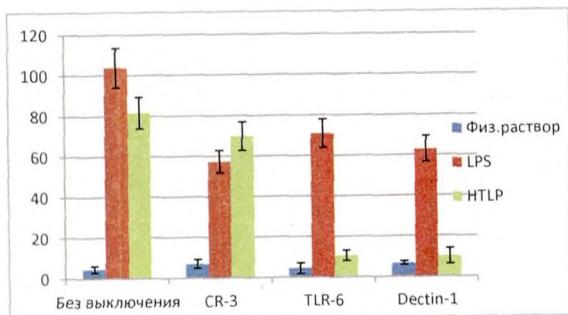
**Таблица 2. Результаты оценки противолучевой активности полисахарида HTLP.**

Время введения	Доза препарата, мкг/мышь	800 рад			850 рад		
		Число животных	Выжило		Число животных	Выжило	
			Абс	%		Абс	%
За 1 час	1	20	13	65	20	0	0,0
	10	20	16	80	20	1	5,0
	100	20	12	60	19	3	15,8
Через 1 час	1	20	16	80	20	4	20,0
	10	20	16	80	20	0	0,0
	100	16	14	87,5	20	2	10,0
Через 6 часов	1	20	19	95	20	2	10,0
	10	19	17	85	20	2	10,0
	100	19	16	84,2	20	1	5,0
Через 24 часа	1	20	16	80	20	7	35,0
	10	20	16	80	20	8	40,0
	100	20	16	80	19	6	31,6

При этих дозах облучения выживаемость мышей в контрольных группах была равна 20% и 0%, для 800 и 850 рад соответственно.

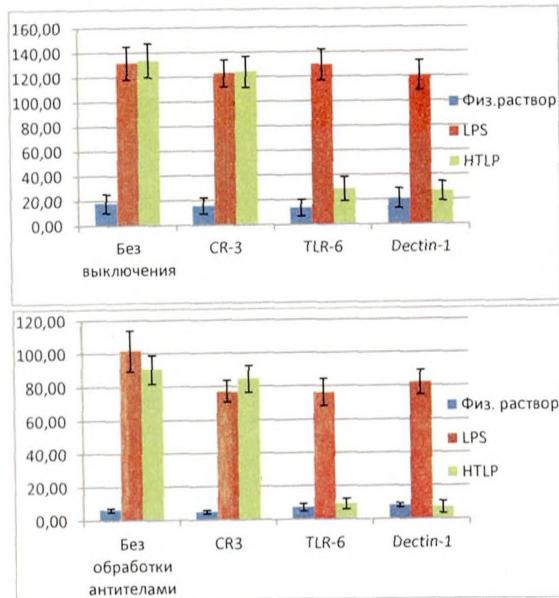
#### *Изучение рецепторного взаимодействия и молекулярных механизмов действия*

Инактивация генов целевых рецепторов и продукция TNF- $\alpha$ . HTLP, как и LPS является стимулятором выработки TNF- $\alpha$ . В сравнении с контролем уровень выработки увеличился в 18,3 раза в случае HTLP и в 23,2 – LPS на 4 час, а на 24 – в 7,4 и 7,3 раза соответственно (рисунок 4 и 5). По оси у – количество TNF- $\alpha$  в культуральной жидкости в пкг/мл. Контрольные значения TNF- $\alpha$  в культурах с единичными выключеными рецепторами в пределах погрешности не отличались от контроля без выключенных рецепторов. В свою очередь HTLP не стимулирует выработку TNF- $\alpha$  в культурах с выключеными генами рецепторов TLR-6 и Dectin-1 в пределах погрешности, что может свидетельствовать о том, что для HTLP необходимы оба рецептора для корректной активации клеток и выработки TNF- $\alpha$ . Учитывая значительную молекулярную массу HTLP, можно предположить, что активация происходит путем одновременного связывания обоих рецепторов, TLR-6 и Dectin-1, что обуславливает действие HTLP на клеточные системы.



**Рисунок 5.** Диаграмма сравнения уровней выработки TNF- $\alpha$  клеточной линии RAW 264.7 с инактивированными генами целевых рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 через 4 ч инкубации.

Блокирование рецепторов антителами и продукция TNF- $\alpha$ . Так же, как и в модели выключения генов, полученные данные демонстрируют, что HTLP стимулирует выработку TNF- $\alpha$ , при этом уровень стимуляции сравним с липополисахаридом. Более того, было подтверждено участие двух рецепторов – Dectin-1 и TLR-6 – в активации клеток при помощи HTLP (рисунок 6).

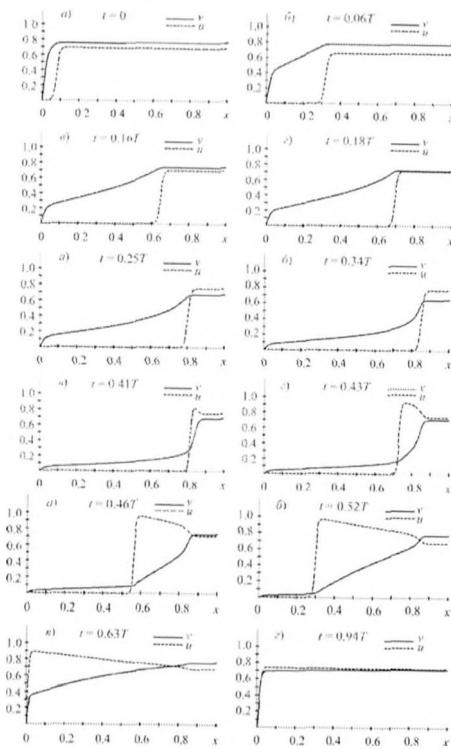


**Рисунок 6.** Диаграмма сравнения уровней выработки TNF- $\alpha$  клеточной линии RAW 264.7 с инактивированными генами целевых рецепторов CR3, Dectin-1 и TLR-6 через 24 часа инкубации.

**Рисунок 7.** Диаграмма сравнения уровней выработки TNF- $\alpha$  клеточной линии RAW 264.7 после обработки антителами целевых рецепторов TLR-6, CR3 и Dectin-1 через 4 часа инкубации.

На рисунках 8–10 приведены рассчитанные зависимости интенсивностей противо- и проапоптотических сигналов от координаты для различных интервалов времени. Значения  $u$  и  $v$  при  $x = 1$  определяют вероятности экспрессии факторов регуляторной сети, ответственных за переход клетки либо в предапоптотическое состояние, либо в состояние,

соответствующее ее выживанию. Максимумы распределения  $u$  и  $v$  по  $x$  соответствуют координатам узлов сети, несущих наибольшую нагрузку в формировании сигналов в данный момент времени.



практически совпадают.

На малых временах ( $t < 0.18$ ) интенсивность противоапоптотического сигнала, поступающего в геном, выше интенсивности проапоптотического сигнала, и вероятность выживания клетки больше вероятности гибели (рисунок 8). Передача проапоптотического сигнала в геном приводит к увеличению экспрессии TNF и TNFR1, что, в свою очередь, приводит к увеличению вероятности формирования каспазного проапоптотического комплекса и переключению клетки на путь к предапоптотическому состоянию или апоптозу. Миграции TNF и TNFR1 к мембране и формированию их комплексов соответствует пространственное расширение проапоптотического сигнала на рисунке 10. Если связывание лиганда с рецептором, приводящее к наработке TNF и TNFR1,

**Рисунок 8.** Пространственное распределение интенсивностей про- и противоапоптотических сигналов на начальных стадиях переноса. Вероятность выживания клетки выше вероятности перехода в предапоптотическое состояние.

**Рисунок 9.** Пространственное распределение интенсивностей про- и противоапоптотических сигналов на промежуточных стадиях переноса. Вероятность перехода клетки в предапоптотическое состояние превышает вероятность выживания.

**Рисунок 10.** Пространственное распределение интенсивностей про- и противоапоптотических сигналов на больших временах. Вероятность выживания клетки снова превышает вероятность перехода в предапоптотическое состояние, но в конце цикла эти вероятности

достаточно продолжительно ( $t > 0,25$ ), то вероятность перехода клетки в предапоптотическое состояние превышает вероятность выживания (рисунок 9). Если же клетка изменена недостаточно, и ее компенсаторные (регуляторные) механизмы работают нормально, то вероятна ситуация, при которой клетка выживет, нивелировав воздействие HTLP. Такой ход событий наблюдается в экспериментах с нормальными клетками, например, мононуклеарах периферической крови доноров.

По мере активации системы происходит частичное перераспределение интенсивностей противо- и проапоптотических сигналов за счет связывания части ингибиторов адапторных белков, участвующих в передаче сигнала, приводящего к апоптозу клетки. Благодаря механизмам обратной связи и противоапоптотическим сигналам, передающимся в геном по пути через NF-кБ, возрастает вероятность обратного переключения клетки, т.е. ее выживания. На больших временах количество рецепторов, связанных с HTLP и TNF, уменьшается за счет деградации, что приводит ко второму переключению поведения клетки и ее выживанию. При этом переключение возможных форм поведения клетки – выживание или переход к апоптозу – становится циклическим.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Очищенный полисахарид HTLP, выделенный из коркового слоя клубней *Helianthus tuberosus L.*, является проявляющим свойства полиэлектролита  $\beta$ -гликаном с  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) и  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) гликозидными связями и с молекулярной массой 1–2 МДа. Именно эти три фактора являются главными в определении его структурных особенностей и, как следствие, проявлениях биологических активностей. Разнообразные  $\beta$ -гликаны, как правило, обладают различными структурными характеристиками, различаясь степенью разветвленности молекулы, молекулярным весом (MW) и конформацией (тройная спираль, однонитевая спираль, структура неупорядоченного клубка) [Sadahiro et al., 2007].

Уже в течение долгого времени, несмотря на некоторые исключения, MW признается критическим параметром, определяющим биологическую активность молекулы. Гликаны с высоким MW обычно обладают более высокой биоактивностью [El Enshasy et al., 2013; Paterson et al., 2014]. Для того чтобы вызвать биологический эффект, полисахарид должен первоначально взаимодействовать с рецепторами клеточной поверхности. Полисахариды с высоким молекулярным весом (MW) могут с большей частотой контактировать с рецепторами и вызывать внутриклеточные сигнальные каскады. Кроме того, крупные полисахариды обладают большим числом повторяющихся звеньев и, следовательно, большим набором свободных биологически активных связей.

На примере HTLP также можно проследить ту же закономерность. Адьювантной активностью к ЭБ обладал только высокомолекулярный пик, с MW 1–2 МДа.

Следует обратить внимание и на тот факт, что молекула HTLP является заряженной молекулой, что, безусловно, сказывается и на характере взаимодействия с рецепторами. Так, фракции HTLP после ионообменника DEAE 650 S TSK проявляли совершенно разную адьювантную активность. Фракция нейтральных полисахаридов таковой активностью не обладала вовсе.

Очищенная полисахаридная фракция, HTLP, представлена гетерополисахаридом, состоящим в основном из глюкозы, галактозы, глюкуроновой и галактуроновой кислот с небольшим количеством рамнозы, арабинозы, маннозы, что видно как из ВЭЖХ анализа, так и ЯМР, с 0,5% содержанием белка.

Тип гликозидной связи является еще одним важным фактором для противоопухолевой и иммуностимулирующей активности. В этом смысле молекулу HTLP можно назвать уникальной. Наиболее изучены (1→3)- и (1→6)- $\beta$ -D-глюканы. Полисахарид HTLP, в свою очередь, характеризуется наличием как  $\beta$ -(1→4), так и  $\beta$ -(1→3) связей, которые необходимы для проявления им биологической активности, что было установлено с помощью ферментативной обработки. HTLP помимо глюкозы содержит много галактозы и уроновых кислот. Поэтому можно провести аналогию с каррагинанами, структурное разнообразие которых обусловлено присутствием биологически активных  $\beta$ -(1→4)-остатков в виде 3,6-ангиогалактозы.

Полисахаридная субстанция HTLP проявляла антиметастатическую активность в широком диапазоне концентраций: и в 1,5 мкг на животное, и в 100 мкг в экспериментальной модели карциносаркомы Уокера *in vivo*. Учитывая наличие иммуномодулирующей активности у полисахарида из *Helianthus tuberosus L.*, можно утверждать, что полисахарид обладает прямым и непрямым противоопухолевым действием.

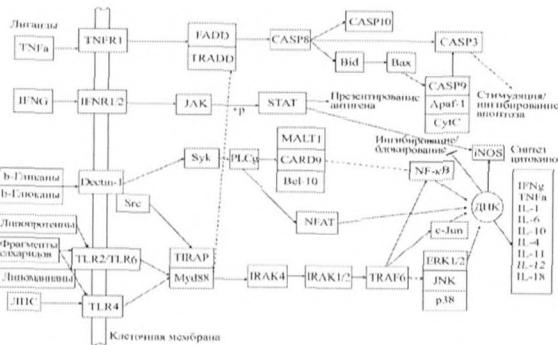
Если сравнивать две выбранные экспериментальные модели, то модель метастазирующей карциномы легких Льюиса является наиболее адекватной, приближенной к реальным событиям в организме для изучения антиметастатической активности полисахарида. Поскольку карцинома Уокера проявляет свойства органотропности к легким, то развивающиеся опухолевые узлы, возможно, правильнее рассматривать как первичную опухоль, а не как истинные метастазы. На основании этого допущения мы предполагаем, что эта разница является определяющей в объяснении антиметастатической активности HTLP. Из литературных данных известно, что процесс метастазирования включает сложный каскад процессов, включая клеточную адгезию,

миграцию, инвазию, межклеточные взаимодействия и взаимодействие клетки с внеклеточным матриксом. Адгезия между опухолевыми клетками и эндотелиальными клетками сосудов является одним из важнейших факторов метастазирования раковых клеток [Wan et al., 2013]. В субпопуляции метастатических раковых клеток по сравнению с доброкачественными или нормальными клетками высоко экспрессируется галектин-3 [Iurisci et al., 2000]. Галектин-3 участвует в различных биологических процессах, таких как межклеточные взаимодействия, пролиферация, дифференцировка, апоптоз [Liu et al., 2005; Thijssen et al., 2007]. Галектин-3 способствует прогрессии опухоли и маскированию трансформированных от иммунокомпетентных клеток путем связывания с рецепторами Т-клеток, что приводит к ингибированию активации Т-клеток и апоптозу Т-клеток [Fukumori et al., 2003].

Предполагается, что одним из возможных объяснений антиметастатической активности HTLP является ингибирование им рецептора галектина-3. В работе Ксяоге Гао [Gao et al., 2013] описана структура молекулы галектина-3, которая имеет С-концевую область, распознающую углеводы (CRD), специфически связывающуюся с бета-галактозидами и N-концевую область, обогащенную пролипом и глицином, которая имеет центр связывания линейного тетрасахарида в виде канавки [Seetharaman et al., 1998].

Полученные данные по инактивации генов целевых рецепторов TLR-6, CR3 и Dectin-1 макрофагов и блокировании их моноклональными антителами однозначно свидетельствуют об участии двух рецепторов – Dectin-1 и TLR-6 – в активации макрофагальных клеток RAW 264.7 полисахаридом HTLP, поскольку при выключении генов хотя бы одного рецептора выработка цитокина TNF- $\alpha$  в пределах погрешности не отличается от значений в контрольной культуре клеток. Таким образом, для проявления биологической активности (активации клеток и выработки цитокинов) HTLP необходимы оба рецептора – Dectin-1 и TLR-6. В связи с этим возможно несколько способов взаимодействия полисахаридной молекулы и клеточных рецепторов и передачи внутриклеточного сигнала.

Во-первых, за счет большой молекулярной массы возможно связывание HTLP сразу с двумя рецепторами, что приводит к активации сразу двух сигнальных каскадов, которые обладают эффектом синергизма при участии транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B. Активация NF- $\kappa$ B при связывании с Dectin-1 происходит при участии Src, Syk и CARD9-MALT1-Bcl-10. TLR-6, скорее всего, не участвует в связывании с полисахаридом отдельно от TLR-2, что показано в нескольких работах [Gillaux et al., 2011; Zhang et al., 2008]. Рецепторный комплекс TLR-6/TLR-2, взаимодействуя с HTLP, приводит к передаче сигнала на NF- $\kappa$ B по пути через TIRAP-Myd88, IRAK4, IRAK1/2 и TRAF6 (рисунок 11).



**Рисунок 11.**  
Сигнальные пути  
Dectin-1, TLR-6,  
TNFR, IFNR  
[модифицирована  
первоначальная схема  
из KEGG data base  
[\[www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway\]](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway)].

Во-вторых, возможно первичное связывание с одним из рецепторов, Dectin-1 или TLR-6, после чего происходит димеризация рецепторов или вторичное связывание с другим рецептором. При этом первичное связывание, наиболее вероятно, происходит с рецептором Dectin-1, а не TLR-6, по той причине, что активация комплекса TLR-6/TLR-2 приводит к запуску проапоптотического каскада по CASP8 пути, что должно приводить к гибели клеток. Тем не менее, гибели клеток в модели колониестимулирующей активности не наблюдается, наоборот, HTLP является стимулятором колониеобразования, что связано с совместной активацией TLR-6 полисахаридом и TNF-R1 лигандом. Такое взаимодействие приводит к смещению внутриклеточного сигнального пути в сторону противоапоптотического сигнального каскада TRADD посредством TIRAP-Myd88 и мобилизации RIPK и TRAF2. Последняя, взаимодействует с протеинкиназой IKK, что позволяет серин- треониновой киназе RIPK активировать NF- $\kappa$ B. Белок I $\kappa$ B $\alpha$ , находящийся в комплексе с NF- $\kappa$ B, ингибирует его транслокацию, происходит фосфорилирование IKK и последующая деградация с высвобождением NF- $\kappa$ B, который транслюцируется в ядро и опосредует транскрипцию множества белков, участвующих в выживании и пролиферации клеток, воспалительной реакции и антиапоптотических факторов. В дополнение к этому TNF- $\alpha$  может усиливать пролиферацию клеток по сигнальному пути JNK с активацией AP-1. Однако, учитывая совместную активацию TLR-6 и Dectin-1, следует предположить, что она, скорее всего, идет по сигнальному пути NF- $\kappa$ B (рисунок 11).

В-третьих, существует вероятность наличия некоего стороннего рецептора, для которого HTLP является лигандом, но при этом и Dectin-1, и TLR-6 необходимы для активации внутриклеточного каскада. Однако четырехкомпонентная система активации клеток даже молекулой с большой молекулярной массой представляется маловероятной в силу того, что многокомпонентные системы менее устойчивы. С другой стороны, учитывая время наработки TNF- $\alpha$  (4 часа) и скорость миграции рецепторов на примере T-

клеток с одного полюса клетки к другому ( $3,6\text{--}18$  мкм/час) [Moss et al., 2002], можно предположить, что происходит быстрая активация клетки полисахаридом, после чего комплекс полисахарид-рецепторы распадается и молекула полисахарида постепенно деградирует в растворе.

Любой из описанных выше путей взаимодействия полисахарида с рецепторами приводит к повышенной выработке TNF- $\alpha$ , что и было показано на двух различных моделях. Кроме того, модуляция уровня IL-1 $\beta$  и стимуляция выработки IL-6, позволяют высказать предположение о наличии стабилизации динамического равновесия системы между про- и противовоспалительным ответом клетки при наличии воспалительных факторов. Совместное же действие IL-1 и TNF- $\alpha$ , а также p50-p65 приводят к образованию петли положительной обратной связи по NF-кБ сигнальному пути. При этом IL-6 совместно с TNF- $\alpha$  может вызывать как апоптоз, так и пролиферацию клеток в зависимости от активности AKT, которая ингибитирует ASK1 и MKK4. TNF- $\alpha$  может активировать AKT киназу при этом происходит ингибирование апоптоза. Другой способ внутриклеточного регулирования активности AKT происходит посредством CR3, который при наличии патогена способствует ингибированию AKT, что приводит к подавлению активности ASK1 и MKK4 и запуску проапоптотического сигнального пути.

Интерферон-индукующая активность HTLP, по-видимому, также связана с активацией Dectin-1 и TLR-6 рецепторов, которые при активации на миелоидных и плазматоцитоидных дендритных клетках приводят к их трансформации в T-reg с повышенной продукцией IL-17 [Osorio et al., 2008], на CD4 T-клетках – запуску выживаемости и активации противогрибкового иммунитета, на плазматических клетках – созревание до В-клеток, а их в свою очередь до плазмобластов, с повышенной выработкой антител, а также на NK-клетках – активации противоопухолевого действия иммунной системы [Chiba et al., 2014]. Более того в макрофагах и нейтрофилах IFN- $\gamma$  активирует NADP-оксидазы, повышенную продукцию NO и лизосомальных ферментов. При участии этих рецепторов происходит не только увеличение выработки цитокинов, но и активация макрофагов, нейтрофилов, моноцитов, Т-клеток и дендритных клеток, что, в итоге, приводит к повышенной противомикробной и противовирусной активности [Schroder et al., 2004], что и было обнаружено в опыте по противовирусной активности HTLP.

Применение HTLP при метастазировании предположительно активирует иммунный ответ и стимулирует действие NK- и T-клеток, ответственных за противораковый иммунитет. NK-клетки действуют на трансформированные клетки с повышенным содержанием N-гликанов на поверхности, которые запускают активацию IRF5 транскрипционного фактора через Dectin-1, который стимулирует полноценное

онкогенетическое действие NK-клеток [Chiba et al., 2014]. Поэтому совместная активация NK-клеток через Dectin-1 и TLR-6 будет приводить к торможению роста первичной опухоли и метастазов, который наблюдается при использовании HTLP. При этом цитокины TNF- $\alpha$ , а также IL-1 и IL-6, стимулируют дифференцировку или апоптоз трансформированных клеток. Вместе с тем INF- $\gamma$  стимулирует миграцию иммунных клеток к месту воспаления – трансформированным клеткам, за счет повышения выработки хемокинов и факторов адгезии, а в месте воспаления расширяя сосуды вместе с NO. Повышенные концентрации последнего при этом приводят к лизису онкологических клеток. Такая активность INF- $\gamma$  обладает синергизмом с цитокинами IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$ . В *in vitro* моделях также наблюдалось торможение роста опухолей, что предположительно связано с повышенной выработкой IL-1 $\beta$ , IL-6, а также IFN- $\gamma$ , экспрессию которых запускал HTLP через взаимодействие с рецепторами. Выработка этих цитокинов может приводить к апоптозу онкологических клеток.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Впервые экстрагирована, очищена и охарактеризована биологически активная гептирофагенная фракция полисахаридов из *Helianthus tuberosus L.*, которая содержит гетеро- $\beta$ -гликан HTLP с молекулярной массой 1–2 МДа, содержащий 0,5% белка и боковые вставки  $\beta$ -(1→4)- и  $\beta$ -(1→3)-глюканов, определяющих биологическую активность молекулы.
2. Показано, что HTLP – иммунологически активный полисахарид, который активирует клеточный иммунитет, цитотоксические Т-лимфоциты, макрофаги и естественные киллеры, стимулирует выработку TNF- $\alpha$  и IL-6 и модулирует – IL-1. При этом он не обладает цитотоксичностью, проявляет адьювантные свойства, является индуктором интерферона, обладает радиопротекторными и колониестимулирующими свойствами.
3. Установлено, что HTLP не стимулирует выработку TNF- $\alpha$  в культурах с выключенным генами рецепторов TLR-6 и Dectin-1. Инактивация гена целевого рецептора CR3 не оказывается на выработке TNF- $\alpha$  макрофагальными клетками. Аналогичные данные получены в модели блокировки целевых рецепторов CR3, TLR-6 и Dectin-1 высокоспецифичными моноклональными антителами. HTLP проявляет свою биологическую активность посредством взаимодействия с обоими рецепторами Dectin-1 и TLR-6, но не с CR3.
4. Построена биофизическая модель формирования бифуркационного состояния клетки при воздействии полисахарида на клеточные рецепторы Dectin-1 и TLR-6

на основе уравнения ФитцХью-Нагумо. Показана возможность цикличности переключений между различными формами клеточных ответов на внешнее воздействие.

#### **ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЯХ, ИНДЕКСИРУЕМЫХ В БАЗАХ ДАННЫХ WEB OF SCIENCE, SCOPUS, RSCI, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Генералов Е.А. Структура и радиопротекторные свойства нетоксичного полисахарида из *Helianthus Tuberosus L* // Биофизика. - 2014. - Т. 59. - № 3. - С. 439-445.
2. Генералов Е.А. Спектральные характеристики и моносахаридный состав противовирусного полисахарида индуктора интерферона из *Helianthus Tuberosus L* // Биофизика. - 2015. - Т. 60. - № 1. - С. 65-72.
3. Генералов Е.А. Водно-растворимый полисахарид из *Helianthus tuberosus L*: радиозащитная, колониестимулирующая и иммуномодулирующая активность // Биофизика. - 2015. - Т. 60. - № 1. - С. 73-79.
4. Генералов Е.А., Афремова А.И. Молекулярный механизм действия полисахарида из *Helianthus tuberosus L* // Биофизика. - 2016. - Т. 61. - № 4. - С. 660-668.
5. Генералов Е.А., Левашова И.Т., Сидорова А.Э., Чумаков П.М., Яковенко Л.В. Автоволновая модель бифуркационного поведения трансформированных клеток под действием полисахарида // Биофизика. - 2017. - Т. 62. - № 5. - С. 876-881.

#### **ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ НАУЧНЫХ ИЗДАНИЯХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Генералов Е. А. Физико-химические подходы к анализу природных полисахаридов // AUDITORIUM. - 2015. - Т. 4. - №. 8. - С. 1-17.
2. Generalov E.A. Antimetastatic and tumor growth inhibition activity of polysaccharide from *Helianthus Tuberosus L*. // International journal of cancer prevention research. - 2015. - V. 1. - № 1. - P. 5-10.

#### **Тезисы докладов на научных конференциях:**

1. Генералов Е.А. Стимуляция антителообразующих клеток природным полисахаридом из *Helianthus Tuberosus L*. // СПСРФФ. Тезисы конференции. - 2015. - С. 146-148.
2. Генералов Е.А., Генералова Л.В. Влияние полисахарида из *Helianthus tuberosus L* на число клеток линии RAW 264.7 и синтез TNF-α. // VIII Международная Научная Конференция SCIENCE4HEALTH2017. Тезисы конференции. - 2017. - С. 270.

#### **Монография:**

1. Генералов Е.А. Природные полисахариды – Германия: LAP Lambert Publishing, 2014. - 87 с.

Подписано в печать: 10.10.2017  
Объем 0,1 усл.п.л.  
Тираж: 100 экз. Заказ №108  
Отпечатано в типографии «Реглет»  
125167, г. Москва,  
ул. Черняховского, 4а  
+7 (495) 979-98-99, [www.reglet.ru](http://www.reglet.ru)

3