

*Работа поддержана грантом ДВО РАН по проблеме «Фундаментальные и прикладные исследования в интересах медицины».*

#### References

1. Vorobev V.V. Creation of bioactive pharmaceutical substances and drugs from marine aquatic, *Vestnik biotekhnol.* 2009. V. 4, no. 1. P. 33–38.
2. Ermak I.M., Davydova V.N., Aminin D.L. et al. Immunomodulatory activity of carrageenan from the red algae of the Far Eastern seas, *Pacific Medical Journal.* 2009. No. 3. P. 40–44.
3. Zurochka V.A., Dolgushin I.I., Simbircev A.S. Effect of immunomodulator «Bestim» in vitro on spontaneous and induced production of cytokines IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-8, IL-10 immune cells of blood of healthy individuals, *Citokiny i vospalenie.* 2007. Vol. 6. no.1. P. 31–35.
4. Cytokine and respiratory diseases / eds. B.I. Gelcera, E.V. Prosekoj. Vladivostok: Dalnauka, 2005. 256 p.
5. Totoljan A.A., Frejdlin I.S. The cells of the immune system, Vol. 1, 2. SPb.: Nauka, 2000.
6. Haitov R.M., Ignateva G.A., Sidorovich I.G. Immunology. M.: Medicina, 2002. 536 p.
7. Hotimchenko M.Ju., Sonina L.N. The effectiveness of calcium alginate in toxic liver damage of rats, *Pacific Medical Journal.* 2006. No. 4. P. 27–31.
8. Bienvenu J., Doche C., Gutowski M. et. al. Production of proinflammatory cytokines a cytokines involved in the TH1/TH2 balance is modulated by pentoxifylline, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995. Vol. 25. P. 80–84.
9. Kilpatric D.C. Immunological aspects of the potential role of dietary carbohydrates and lectins in human health, *Eur. J. Nutr.* 1999. Vol. 38. P. 107–117.
10. Lahaye M., Kaeffer B. Seaweed dietary fibres: structure, physicochemical and biological properties relevant to intestinal physiology, *Sciences and Aliments.* 1997. Vol. 17. P. 563–584.
11. Rosha de Souza M.C., Marques C.T., Guerra Dore C.M. et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds, *Journal of Applied Physiology.* 2007. Vol. 19. P. 153–160.

Поступила в редакцию 25.03.2011.

#### EFFECT OF SODIUM ALGINATE ON SPONTANEOUS AND INDUCED CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HEALTHY DONORS IN VITRO

N. V. Sergeeva<sup>1</sup>, L.N. Bogdanovich<sup>1</sup>, Yu.S. Khotimchenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical Association of FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russian Federation), <sup>2</sup>Institute of Marine Biology (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russian Federation)

**Summary** – The paper describes effects of sodium alginate on the spontaneous and induced cytokine production (interleukin 2 and 6 and tumour necrosis factor- $\alpha$ ) by peripheral blood mononuclear cells of 16 healthy donors. As reported, the sodium alginate appears to have considerable concentration-dependent cytokine-induced action on interleukin 2 and weak action on interleukin 6 and tumour necrosis factor- $\alpha$ .

**Key words:** sodium alginate, mononuclear cells, cytokines.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 35–37.

УДК 615.322:577.114:582.272

## ПРЕБИОТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *FUCUS EVANESCENS* И ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

*Т.А. Кузнецова*<sup>1</sup>, *Т.С. Запорожец*<sup>1</sup>, *И.Д. Макаренкова*<sup>1</sup>, *Н.Ф. Тимченко*<sup>1</sup>, *Н.Н. Беседнова*<sup>1</sup>, *Т.Н. Звягинцева*<sup>2</sup>, *Н.М. Шевченко*<sup>2</sup>, *Н.В. Мандракова*<sup>3</sup>, *В.Г. Мельников*<sup>4</sup>

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1),

<sup>2</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022, г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159), <sup>3</sup>Владивостокский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

<sup>4</sup>Международный научно-технический центр (127473 г. Москва, ул. Краснопролетарская, 32–34, а/я 20)

**Ключевые слова:** пребиотики, продукты функционального питания, фукоидан, альгинат.

Проведено исследование пребиотического потенциала полисахаридов (ПС) из бурой водоросли *Fucus evanesens* в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что сульфатированный полисахарид фукоидан и низкомолекулярная альгиновая кислота способствуют усилению роста и накопления биомассы бифидобактерий, т.е. проявляют пребиотическую активность. На модели экспериментального лекарственного дисбактериоза у мышей, получавших эти ПС в составе кисломолочного напитка с бифидобактериями, выявлено восстановление количественного и качественного состава кишечной микрофлоры. Наличие пребиотической активности открывает перспективы для включения исследуемых ПС в состав продуктов функционального питания, биологически активных добавок к пище и синбиотических препаратов для коррекции нарушений микробиотоза у человека.

Большой интерес при разработке лекарственных препаратов и продуктов функционального питания,

Кузнецова Татьяна Алексеевна – д-р мед. наук, зав. лабораторией иммунологии НИИЭМ СО РАМН; тел.: +7 (423) 244-24-46; e-mail: takuznets@mail.ru

предназначенных для коррекции нарушений микробиотоза у человека, представляют биологически активные вещества, наделенные свойствами пребиотиков. Вещества могут быть классифицированы как пребиотики, если обладают следующими свойствами: не расщепляются пищеварительными ферментами в верхних отделах желудочно-кишечного тракта, в неизменном виде достигают толстого кишечника, селективно ферментируются его микрофлорой, стимулируют активный рост бифидобактерий, лактобактерий и других полезных микроорганизмов [14, 15].

В качестве пребиотиков выступают растворимые пищевые волокна – углеводоподобные соединения (полисахариды, олигосахариды), обычно связанные с растительными веществами и составляющие клеточные стенки растений (съедобных злаков, корнеплодов, фруктов, водорослей). Значительный интерес представляют бурые водоросли, которые богаты пищевыми волокнами: 25–75 % от сухого веса, при этом

около 50–85 % приходится на растворимые пищевые волокна [7, 13].

В бурых водорослях содержатся ламинараны, альгинаты, фукоиданы, которые широко используются в качестве составляющих в продуктах функционального питания и лекарственных препаратах. Именно эти полисахариды (ПС) и их производные обладают огромным пребиотическим потенциалом [7, 13].

Объектом нашего исследования явились ПС фукоидан и альгиновая кислота, выделенные из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens*. Ранее нами показано, что фукоидан из этой водоросли обладает широким спектром биологической активности, включая антикоагулянтную, иммуномодулирующую, противоопухолевую, антибактериальную, антивирусную, липидемическую и др. [1].

Целью настоящей работы послужил анализ пребиотической активности фукоидана и альгиновой кислоты из бурой водоросли *Fucus evanescens* в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

**Материал и методы.** Фукоидан (сульфатированный полисахарид) из бурой водоросли Охотского моря *F. evanescens* является 1→3;1→4- $\alpha$ -L-фуканом с молекулярной массой 20–40 кДа, его моносахаридный состав представлен фукозой, галактозой, ксилозой, глюкозой в соотношении 71:9:10:8. Низкомолекулярная альгиновая кислота является сополимером  $\beta$ -D-маннуроновой и  $\alpha$ -L-гулууроновой кислот в соотношении 4:1. В качестве пробиотика использованы производственные штаммы *Bifidobacterium longum* V379M и *Bifidobacterium bifidum* 791.

Исследование пребиотических свойств биологически активных веществ проводили с использованием кинетических моделей роста микроорганизмов фотометрическим методом [2] путем оценки их влияния на динамику роста и размножения бифидобактерий при культивировании в гидролизатно-молочной (ГМ) среде *in vitro*. Эксперименты осуществляли в двух вариантах:

1) в качестве углеводной основы питательной среды ГМ для культивирования бифидобактерий использовали лактозу с известным составом редуцирующих сахаров, а также дополнительно вносили фукоидан или альгинат либо их композицию;

2) в качестве углеводной основы питательной среды для культивирования бифидобактерий вместо лактозы использовали фукоидан, альгинат либо их композицию.

В серии предварительных экспериментов были отработаны оптимальные для обогащения среды ГМ концентрации фукоидана и альгиновой кислоты, которые составили 2 и 1 мг/мл соответственно. Во втором варианте концентрация ПС составляла по 8 мг/мл, что соответствует количеству лактозы согласно прописи приготовления среды ГМ. Контролем служила среда с лактозой в качестве источника углеводов. Все среды стерилизовали и параллельно засеивали культурой бифидобактерий в количестве 10 % от общего объема среды.

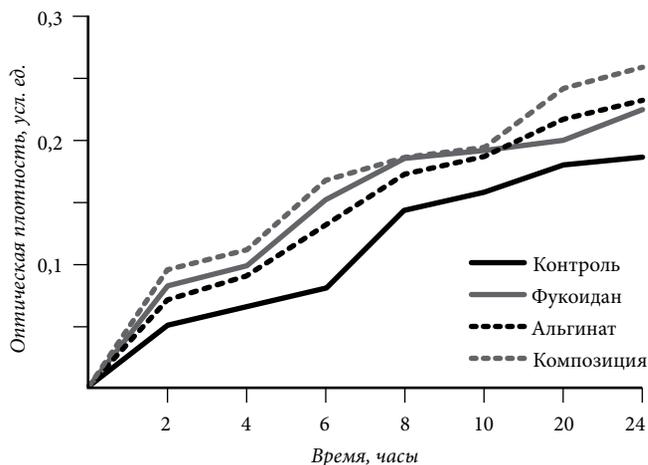


Рис. 1. Динамика роста штамма *B. bifidum* 791 на среде ГМ, обогащенной ПС из *F. evanescens*.

Пробы отбирали через 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20 и 24 часа и анализировали по показателям оптической плотности, которую измеряли при 540 нм на Multiscan RC (Labsystems). Опыт ставили в триплетах. Вычисляли среднюю оптическую плотность для контроля и опыта. Количество живых бифидобактерий в КОЕ/г (lg) после культивирования в бифидум-среде определяли методом серийных разведений. Модель экспериментального лекарственного дисбактериоза воспроизводили путем внутрибрюшинного введения антибиотика гентамицина неинbredным белым мышам. С лечебной целью животные опытной группы получали двукратно перорально в течение 1 месяца (начиная с 1-го дня от введения антибиотика) кисломолочный напиток с бифидобактериями, обогащенный ПС из *F. evanescens*. У мышей проводили микробиологическое исследование кала с определением видового состава и количественного уровня основных микробных популяций в динамике.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программы Statistica 7. Для оценки значимости различий при нормальном распределении количественных признаков использовали *t*-критерий Стьюдента.

**Результаты исследования.** Сравнительный анализ показателей оптической плотности, характеризующих процесс культивирования бифидобактерий на контрольной и опытной (обогащенной ПС) средах, свидетельствовал о том, что нарастание биомассы происходило пропорционально времени культивирования при отсутствии выраженной лаг-фазы – периода между посевом культуры бактерий и началом ее размножения (рис. 1). При внесении ПС показатели оптической плотности на сроках исследования от 4 часов и во все последующие сроки были значимо выше по сравнению с контролем. Также значительно возрастал конечный выход биомассы бифидобактерий. Через 24 часа культивирования на среде, обогащенной ПС, содержание бифидобактерий при внесении фукоидана составляло  $8,5 \pm 0,3 \times 10^9$  КОЕ/г, альгината –  $11,5 \pm 0,4 \times 10^9$  КОЕ/г;

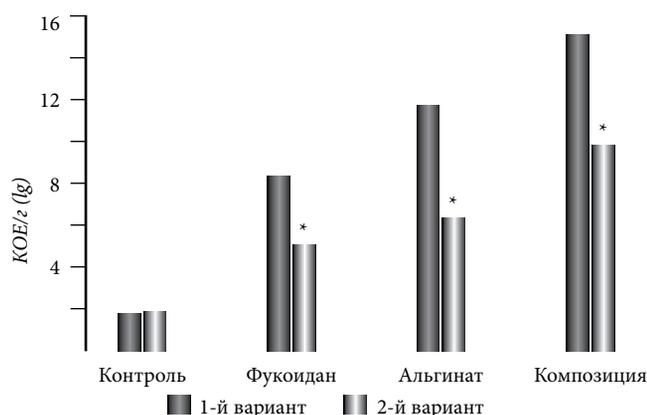


Рис. 2. Содержание бифидобактерий через 24 часа культивирования:

1-й вариант – обогащение ПС среды ГМ; 2-й вариант – использование ПС вместо лактозы. \* Разница с 1-м вариантом статистически значима.

композиции –  $15 \pm 0,8 \times 10^9$  КОЕ/г, что было значимо выше, чем в контроле, где содержание бифидобактерий составило  $1,66 \pm 0,3 \times 10^9$  КОЕ/г (рис. 2).

На рис. 3 представлены кривые роста бифидобактерий на модифицированной среде ГМ, где вместо лактозы использовали фукоидан, альгинат либо их композицию. При внесении ПС динамика роста бифидобактерий несколько изменялась по сравнению с контролем: период постепенного (экспоненциального) роста сменялся значительным усилением роста (через 8 часов от начала культивирования), что проявлялось в виде скачка на кривой. Конечный выход биомассы бифидобактерий увеличивался в 3–5,8 раза. Так, на ГМ среде с лактозой этот показатель составил  $1,75 \pm 0,25 \times 10^9$  КОЕ/г, на среде с фукоиданом возрастал до  $5,3 \pm 0,3 \times 10^9$  КОЕ/г, а на среде с альгинатом – до  $6,5 \pm 0,3 \times 10^9$  КОЕ/г, при использовании же их композиции он увеличивался до  $9,75 \pm 0,85 \times 10^9$  КОЕ/г (рис. 2).

Таким образом, в экспериментах *in vitro* мы показали, что обогащение питательной среды фукоиданом и альгинатом стимулирует рост бифидобактерий. Выход биомассы при этом увеличивался в 5,3–9,4 раза. При использовании в качестве углеводной основы питательной среды для культивирования бифидобактерий фукоидана и альгината вместо лактозы выход биомассы увеличивался в 3,0–5,8 раза.

При экспериментальном дисбактериозе изменения состава кишечной микрофлоры у мышей соответствовали I–II степени дисбактериоза и сопровождалась значительным снижением количества бифидобактерий ( $3,6 \pm 1,6 \times 10^6$ /г) по сравнению с исходным ( $1,44 \pm 0,48 \times 10^8$ /г). Также отмечалось снижение количества лактобактерий ( $5,2 \pm 3,4 \times 10^5$ /г, исходно –  $3,8 \pm 1,5 \times 10^6$ /г) и энтерококков ( $1,2 \pm 0,3 \times 10^6$ /г, исходно –  $6,0 \pm 1,5 \times 10^6$ /г). Обращало на себя внимание увеличение содержания бактерий рода *Clostridium* ( $3,9 \pm 0,4 \times 10^5$ /г, исходно –  $1,3 \pm 0,3 \times 10^4$ /г) и рода *Proteus* ( $7,8 \pm 0,3 \times 10^7$ /г, у интактных мышей –  $2,1 \pm 0,3 \times 10^6$ /г).

У мышей, получавших с лечебной целью напиток, после месячного курса лечения выявлено

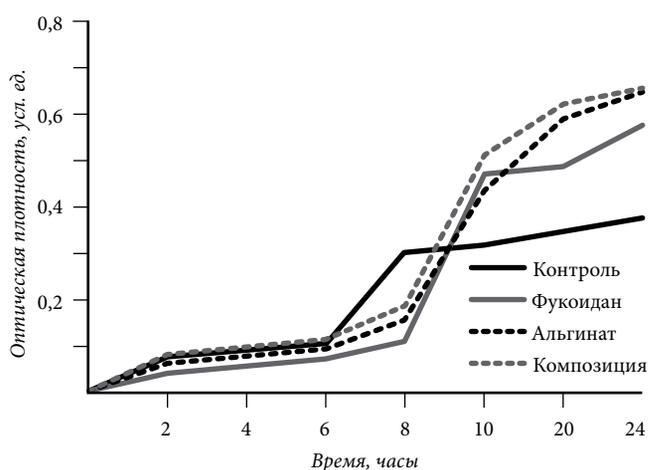


Рис. 3. Динамика роста штамма *B. bifidum* 791 на среде ГМ, содержащей разные источники углеводов.

статистически значимое повышение содержания бифидо- ( $1,9 \pm 0,4 \times 10^{10}$ /г) и лактобактерий ( $7,4 \pm 0,3 \times 10^8$ /г), а также снижение содержания условно-патогенной микрофлоры в кишечнике. В частности, наблюдалась элиминация *Staphylococcus saprophyticus*, исходно присутствующего в кишечнике, и бактерий рода *Proteus*, содержание которых в отсутствие лечения, наоборот, возрастало.

**Обсуждение полученных данных.** Основным компонентом питания бифидо- и лактобактерий являются углеводы (моно-, олиго-, полисахариды). Ферментация углеводов анаэробными микроорганизмами осуществляется с помощью набора гликозидаз (гликозилгидролаз) и лиаз с образованием короткоцепочечных жирных кислот (преимущественно уксусной и молочной и др). Подавляющее большинство бифидобактерий демонстрируют наличие галактозидаз, глюкозаминидаз, ксилозидаз, маннозидаз и др. Ключевым ферментом в метаболизме углеводов бифидобактериями является фруктозо-6-фосфатаза [4, 6]. У некоторых видов бифидобактерий (*B. bifidum*, *B. longum* ssp. *infantis*, *B. breve*) выявлена продукция фукозидазы – фермента, расщепляющего фукозу (структурного компонента фукоиданов) [3, 12]. Благодаря наличию этого фермента, олигосахариды фукоидана и альгината ферментируются кишечной микрофлорой *in vitro*, стимулируют рост бифидо- и лактобактерий, что свидетельствует об их пребиотических потенциях [8, 10, 11].

Что касается эффектов *in vivo* (полученных при кормлении животных препаратами или водорослевыми экстрактами, содержащими фукоидан, ламинаран, альгинат), то эти результаты варьируют. Это связано как со структурными характеристиками исследуемых ПС, так и с другими особенностями проведения экспериментов. Если отдельные авторы не выявили положительного эффекта, то в подавляющем большинстве работ показано нормализующее и стимулирующее действие диетических добавок или экстрактов водорослей, содержащих альгинат

или фукоидан, на состав кишечной микрофлоры [5, 8, 9]

Наши исследования показали, что фукоидан и альгинат из *F. evanescens* стимулируют рост и накопление биомассы бифидобактерий при их культивировании на питательной среде, обогащенной фукоиданом, альгинатом либо их композицией, а также на среде, где эти ПС использовали вместо лактозы. Данные, касающиеся второго варианта наших экспериментов, косвенно свидетельствуют об активном усвоении бифидобактериями исследуемых ПС. Последние, по всей вероятности, служат для них источником углерода и энергии. Таким образом, фукоидан и альгинат из *F. evanescens* проявляют пребиотическую активность, свойственную пищевым волокнам.

Примечательно, что эффект композиции «фукоидан–альгинат» на накопление биомассы бифидобактерий был значимо выше, чем при обогащении питательной среды только фукоиданом, что свидетельствует о синергизме пребиотического эффекта этих полисахаридов.

Пребиотический потенциал исследуемых ПС, проявляющийся нормализацией состава кишечной микрофлоры, подтвержден нами и в экспериментах *in vivo* на модели лекарственного дисбактериоза у мышей.

Наличие пребиотической активности у ПС из *F. evanescens* открывает перспективы для их включения в состав продуктов функционального питания, биологически активных добавок к пище и синбиотиков (препаратов, полученных в результате рациональной комбинации про- и пребиотиков) для коррекции нарушений микробиоценоза у человека.

*Работа выполнена в рамках проекта МНТЦ №4000 от 01.05.2010 г. «Клинико-иммунологическая эффективность нового синбиотического продукта категории функционального питания (кисломолочный напиток с *V. bifidum*, обогащенный полисахаридами из бурой водоросли *Fucus evanescens*)», а также при поддержке гранта РФФИ 09-04-00761 и программы РАН «Клеточная и молекулярная биология».*

#### Литература

#### References

1. Zaporozhec T.S., Kuznecova T.A., Smolina T.P. et al. Immunotropic and anticoagulant properties of fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens*: perspectives of approach in medicine, *Zhurn. mikrobiol.* 2006. No. 3. P. 54–58.
2. Skala L.Z., Nehorosheva A.G., Vinokurov A.E., Lukin I.N. Up-to-date technology in clinical microbiology and chemotherapy. Automated workplace of microbiologist, epidemiologist and chemotherapist, *Klin. lab. diagnostika.* 2001. no. 12. P. 25–32.
3. Ashida H., Miyake A., Kiyohara M. et al. Two distinct alpha-L-fucosidases from *Bifidobacterium bifidum* are essential for the utilization of fucosylated milk oligosaccharides and glycoconjugates, *Glycobiology.* 2009. Vol. 19. P. 1010–1017.
4. Goderska K., Nowak J., Czarnecki Z. Comparison of the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* species in media supplement with selected saccharides including prebiotics, *Acta. Sci. Pol., Technol. Aliment.* 2008. Vol. 7, No. 2. P. 5–20.
5. Janczyk P., Pieper R., Smidt H., Souffrant W.B. Effect of alginate and inulin on intestinal microbial ecology of weanling pigs reared under different husbandry conditions, *FEMS Microbiol. Ecol.* 2010. Vol. 72. P. 132–142.

6. Jedrzejak M.J. Structural and functional comparison of polysaccharide-degrading enzymes, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2000. Vol.35, No. 3. P. 221–251.
7. Jimenez-Escrig A., Sanchez-Muniz F.J. Dietary fiber from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism, *Nut. Res.* 2000. Vol. 20. P. 585–598.
8. Kuda T., Yano T., Matsuda N., Nishizawa M. Inhibitory effects of laminaran and low molecular alginate against the putrefactive compounds produced by intestinal microflora *in vitro* and in rats, *Food Chem.* 2005. Vol. 91. P. 745–749.
9. Lynch M.B., Sweeney T., Callan J.J. et al. The effect of dietary Laminaria-derived laminarin and fucoidan on nutrient digestibility, nitrogen utilisation, intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs, *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2010. Vol. 90, No. 3. P. 430–437.
10. Marzorati M., Verhelst A., Luta G. et al. *In vitro* modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements, *Int. J. Food Microbiol.* 2010. Vol. 139. P. 168–176.
11. Michel C., Benard C., Lahaye M. et al. Algal oligosaccharides as functional foods: *in vitro* study of their cellular and fermentative effects, *Food Sci.* 1999. Vol. 19. P. 311–332.
12. Nagae M., Tsuchiya A., Katayama T. et al. Structural basis of the catalytic reaction mechanism of novel 1,2-alpha-L-fucosidase from *Bifidobacterium bifidum*, *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282. P. 18497–18509.
13. O'Sullivan L., Murphy B., McLoughlin P. et al. Prebiotics from Marine Macroalgae for Human and Animal Health Applications, *Mar. Drugs.* 2010. Vol. 8. P. 2038–2064.
14. Roberfroid M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *American Journal of Clinical Nutrition.* 2000. Vol. 71, No. 6. P. 1682–1687.
15. Tungland B.C., Meuer D. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food, *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety.* 2002. Vol., No. 3. P. 73–92.

Поступила в редакцию 27.05.2011.

#### PREBIOTIC PROPERTIES OF POLYSACCHARIDES FROM BROWN SEAWEED *FUCUS EVANESCENS* AND PERSPECTIVES FOR CLINICAL USING

T.A. Kuznetsova<sup>1</sup>, T.S. Zaporozhetz<sup>1</sup>, N.N. Besednova<sup>1</sup>, I.D. Makarenkova<sup>1</sup>, N.F. Timchenko<sup>1</sup>, T.N. Zvyagintseva<sup>2</sup>, N.M. Shevchenko<sup>2</sup>, N.V. Mandrakova<sup>3</sup>, V.G. Melnikov<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), <sup>2</sup>Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch of the Russian Academy of Science (159 100 Ann. of Vladivostok Av. Vladivostok 690022 Russia), <sup>3</sup>Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia), <sup>4</sup>International Science and Technology Center (20 box 32–34 Krasnoproletarskaya St. Moscow 127473 Russia)

**Summary** – The prebiotic potential of polysaccharides (PS) from brown seaweed *Fucus evanescens* were studied *in vitro* and *in vivo* experiments. We established that fucoidan and alginic acid stimulate the growth and accumulation of bifidobacteria biomass, i.e. these PS possess prebiotic activity. We revealed the restoration of quantitative and qualitative composition of intestinal microflora (increasing content of bifido- and lactobacteria, typical *Escherichia coli* and reduction of opportunistic microflora) in mice with antibiotic-induced dysbiosis, treated with fermented by bifidobacteria and enriched with these PS milk. The presence of prebiotic activity opens the perspectives for inclusion of this PS to products of functional food, dietary supplements and sinbiotic preparations for the correction of human's microbiota disorders.

**Key words:** prebiotics, products of functional food, fucoidan, alginate.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 37–40.