

10. Mytar B., Gawlińska M., Szatanek R. et al. Induction of intracellular cytokine production in human monocytes/macrophages with ligands of pattern recognition receptors // *Inflamm. Res.* 2004. Vol. 101, No. 3. P. 100–106.
11. Ponce N.M., Pujol C.A., Damonte E.B. et al. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies // *Carbohydr. Res.* 2003. Vol. 338, No. 2. P. 153–165.
12. Preeprame S., Hayashi K., Lee J.B. et al. A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri* // *Chem. Pharm. Bull.* 2001. Vol. 49, No. 4. P. 484–485.
13. Zhu W., Chiu L.C., Ooi V.E. et al. Antiviral property and mode of action of a sulphated polysaccharide from *Sargassum patens* against herpes simplex virus type 2 // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2004. Vol. 24, No. 3. P. 279–283.
14. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O. et al. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions // *J. Exp. marine Biol. Ecol.* 2003. Vol. 294, Is. 1. P. 1–13.

Поступила в редакцию 07.04.2009.

PROTECTIVE EFFECTS OF FUCOIDAN DERIVED FROM BROWN ALGAE *LAMINARIA JAPONICA* UNDER EXPERIMENTAL TICK-BORNE ENCEPHALITIS
I.D. Makarenkova¹, N.V. Krylova¹, G.N. Leonova¹, N.N. Besednova¹, T.N. Zvyagintseva², N.M. Shevchenko²
¹ Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the RAMS, Siberian Branch (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia),
² Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100-Anniversary Av. Vladivostok 690022 Russia)
Summary – The paper provides experimental study into the protective effects of sulphated polysaccharide fucoidan derived from the sea brown algae *Laminaria japonica* after in vivo infecting mice with highly pathogenic strain of tick-borne encephalitis virus. As reported, the drug efficiency depends on dose and dosing regimen, and it allows obtaining adequate protection in infected animals. A wide range of biological effects produced by the sulphated polysaccharides extracted from the sea brown algae, low toxicity and environmentally friendly production technologies offer great opportunities of applying fucoidans in an effort to prevent and treat viral infections.
Key words: virus, tick-borne encephalitis, fucoidan, protective effects, survival rate.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 83–86.

УДК 616-006-085.322:582.272:577.14

О.С. Вишук¹, С.П. Ермакова², Фам Дюк Тин³, Н.М. Шевченко², Буи Минг Ли³, Т.Н. Звягинцева²

¹ Дальневосточный государственный университет (690950 г. Владивосток, ул. Октябрьская, 27), ² Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Россия (690022 г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159), ³ Нячангский институт технологических исследований и применений ВАНТ (Вьетнам г. Нячанг, ул. Хунгвонг, 02)

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ФУКОИДАНОВ БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Ключевые слова: фукоиданы, бурые водоросли, противоопухолевая активность.

Противоопухолевое действие фукоиданов из 9 видов бурых водорослей исследовано на модели мягких агаров. Показано, что фукоиданы нетоксичны к клеткам DLD-1 и HT-29 в концентрациях до 200 мкг/мл. Установлено, что фукоидан из *Laminaria cichorioides*, состоящий из 1,3-связанных молекул α-L-фукозы, ингибирует рост колоний раковых клеток кишечника, а низкосульфатированные фукогалактаны из *Sargassum swartzii*, *S. mcClurei*, *S. denticarpum* практически не обладают противоопухолевой активностью. Полученные результаты демонстрируют, что использование фукоиданов бурых водорослей дальневосточных морей может оказаться перспективным для предотвращения и лечения онкологических заболеваний.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению полисахаридов, выделенных из таких природных источников, как бактерии, грибы, водоросли и растения. Полисахариды бурых водорослей представлены альгиновыми кислотами, ламинаранами и фукоиданами, проявляющими различную биологическую активность. Так, альгинат натрия является самым активным и безвредным природным сорбентом, а также повышает фагоцитарную активность клеток животных и человека [10]. Ламинараны (1,3- и 1,6-β-D-глюканы) известны как противораковые вещества, радио- и криопротекторы, активаторы иммунной системы [3, 15]. Фукоиданы

проявляют чрезвычайно широкий спектр биологической активности, что является причиной повышенного интереса к ним. Так, в литературе имеются сообщения о противоопухолевых и противовоспалительных свойствах фукоиданов [11, 12]. Особый интерес вызывает антикоагулянтное действие фукоиданов [2, 6]. Кроме того, эти соединения, как правило, являются иммуностимуляторами [13]. По этой причине их можно отнести к так называемым «поливалентным биомодуляторам». Однако интенсивность изучения биологической активности фукоиданов значительно опережает исследования их химической структуры.

Имеется небольшое количество данных о связи структуры и биологической активности этих полисахаридов. Считается, что биологическая активность фукоиданов обусловлена в первую очередь степенью сульфатирования, наличием фрагментов определенной структуры. Кроме того, она может быть связана с моносакхаридным составом, степенью разветвленности, типом связи, молекулярно-массовым распределением [1, 9, 14]. С определенной уверенностью установить структурный мотив, который отвечает за проявление той или иной биологической активности фукоиданов, пока так и не удалось.

Целью настоящей работы явился анализ противоопухолевой и антимагистатической активности фукоиданов, выделенных из различных бурых

Ермакова Светлана Павловна – канд. хим. наук, старший научный сотрудник лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН, тел: 8 (4232) 31-07-05, добавочный.4; e-mail: swetlana_e@mail.ru.

водорослей и имеющих разную структуру, на модели мягких агаров.

Материалы и методы. Реагенты и материалы: DEAE – целлюлоза и мембраны 3 кДа – коммерческие препараты фирмы Sigma и Millipore (США) соответственно; органические растворители, неорганические кислоты и соли – коммерческие препараты фирмы «Диаэм» (Россия); клеточные линии HT-29, DLD-1 были предоставлены Hormel Institute University of Minnesota (Austin, MN США). Среда RPMI-1640 – 10% фосфатный буфер с добавлением пенициллина (100 Ед/л) и стрептомицина (100 мкг/л). Фосфатный буфер, пенициллин, стрептомицин, L-глутамин, трипсин, этилендиаминтетрауксусная кислота, эмбриональный бычий альбумин, гидрокарбонат натрия, агар – коммерческие препараты фирмы «Биолот» (Россия). **Водоросли:** бурая водоросль *Fucus evanescens* была собрана в экспедиции НИС «Академик Опарин» в июле 2003 г. на побережье острова Большой Шантар Охотского моря; *Laminaria japonica*, *Undaria pinatifida*, *L. cichorioides* были собраны в июле 2005 г. в бухте Троица Японского моря на Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН; *Sargassum* sp. были собраны в Южно-Китайском море у побережья Вьетнама в мае–июне 2007 г. **Полисахариды:** фукоиданы были выделены по модифицированному методу [4].

Определение содержания общих углеводов в выделенных образцах полисахаридов проводили колориметрически с помощью феноло-серноокислотного метода [8]. **Определение содержания сульфатных групп** в полисахаридах проводили с помощью титриметрического метода [7]. **Кислотный гидролиз полисахаридов:** образец фукоидана (5 мг) растворяли в 0,5 мл 2М трифторуксусной кислоты; реакцию смесь нагревали при 100°C в течение 6 часов. Моносахаридный состав определяли на углеводном анализаторе Biotronik IC-5000 (Германия), используя колонку Shim-pack ISA-07/S2504 (0,4×25 см); элюировали калиево-боратным буфером, скорость элюции – 0,6 мл/мин; обнаружение проводили бихинхонинатным методом; интегрирующая система Shimadzu C-R2 AX.

¹³C-ЯМР-спектроскопия: спектры ¹³C-ЯМР для растворов веществ в D₂O были получены на ядерно-магнитно-резонансном спектрометре Bruker Avance DPX-300 NMR с рабочей частотой 75,5 МГц при температуре 60°C.

Культивирование клеток: клетки рака кишечника человека HT-29 и DLD-1 культивировали в питательной среде RPMI-1640, 10% FBS с добавлением пенициллина (100 Ед/л) и стрептомицина (100 мкг/л) в инкубаторе MCO-18AIC, SANYO (Япония) при температуре 37°C, содержание CO₂ – 5%.

Определение цитотоксичности фукоиданов. Клетки рака кишечника человека HT-29 и DLD-1 (5×10⁴/мл) рассеивали в 96-луночные планшеты и культивировали в 200 мкл 10% RPMI-1640 в CO₂-инкубаторе при

температуре 37°C в течение 24 часов. Затем клетки обрабатывали фукоиданами различной концентрации (10, 50, 100 и 200 мкг/мл) и инкубировали в течение 24 часов. После инкубации добавляли по 15 мкл 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромида (MTS-реагент) и инкубировали 4 часа (37°C, 5% CO₂). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Bio-Tek Instruments (США), при длине волны 490/630 нм (A_{490/630}).

Неопластическая трансформация клеток (метод мягких агаров). Действие фукоиданов бурых водорослей на формирование и рост колоний клеток рака кишечника человека определяли с помощью метода мягкого агара [5]. Клетки рака кишечника (8×10³ клеток) обрабатывали фукоиданами из бурых водорослей *L. cichorioides*, *F. evanescens*, *U. pinatifida*, *L. japonica*, *Sargassum swartzii*, *S. oligocystum*, *S. denticarpum*, *S. McClurei*, *S. polycystum*. (50, 100 мкг/мл). Клетки культивировали при 37°C (5% CO₂) в течение 30 дней. Колонии клеток были оценены с использованием обратимого микроскопа Motic AE 20 (Китай) и программы Motic Image Plus.

Статистическая обработка данных проведена с использованием t-критерия Стьюдента в условиях заданной доверительной вероятности, равной 95% (программа SigmaPlot 2000, вер. 6, SPSS Inc., США).

Результаты исследования. Фукоиданы бурых водорослей были очищены при помощи описанной выше комбинации методов. Фукоиданы, выделенные из бурых водорослей дальневосточных морей, являются высокосульфатированными полисахаридами, тогда как фукоиданы из бурых водорослей Южно-Китайского моря – низкосульфатированные, за исключением фукоидана из *S. polycystum*. Содержание сульфатов в фукоиданах из *L. cichorioides* и *U. pinatifida* составляет 38 и 36% соответственно. Фукоиданы из *F. evanescens*, *L. japonica* и *S. polycystum* содержат около 30% сульфатов. В остальных полисахаридах из саргассовых водорослей содержание сульфатных групп составляет менее 12%.

Анализ моносахаридного состава исследуемых соединений позволяет разделить их на фуканы, фукогалактаны и галактофуканы. Фуканами являются сульфатированные полисахариды из *F. evanescens*, *L. cichorioides*. Фукогалактан выделен из *L. japonica*, галактофукан – из *U. pinatifida*. Все полисахариды из саргассовых водорослей являются фукогалактанами (табл.).

По структуре главной цепи фукоиданы разделялись на три группы:

1. Полисахариды, молекулы которых содержат в главной цепи 1,3-связанные α-L-фукопиранозные остатки (*L. cichorioides*);
2. Полисахариды, молекулы которых построены из чередующихся 1,3- и 1,4-связанных остатков α-L-фукопиранозы (*F. evanescens*);
3. Полисахариды, в главной цепи которых чередуются 1,3-; 1,4-связанные остатки α-L-фукопиранозы

Таблица
Структурные характеристики фукоиданов бурых водорослей

| Водоросль | Молекулярная масса, кДа ¹ | Сульфаты, % | Моносахаридный состав, мольные % | | | | |
|------------------------|--------------------------------------|-------------|----------------------------------|---------|-----------|---------|---------|
| | | | фукоза | манноза | галактоза | ксилоза | глюкоза |
| <i>F. evanescens</i> | 20–40 | 31,0 | 94,9 | 0,2 | 1,93 | 2,8 | 0,0 |
| <i>L. japonica</i> | 20–30 | 26,0 | 59,4 | 5,2 | 43,4 | 2,2 | 9,6 |
| <i>L. cichorioides</i> | 60–80 | 38,0 | 91,8 | 3,5 | 4,6 | 0,0 | 0,0 |
| <i>U. pinnatifida</i> | 30–50 | 36,0 | 33,8 | 2,0 | 61,1 | 0,9 | 2,2 |
| <i>S. swartzii</i> | н/о | 5,9 | 35,8 | 19,2 | 32,3 | 9,9 | 2,8 |
| <i>S. oligocystum</i> | н/о | 9,1 | 41,3 | 8,9 | 38,3 | 7,1 | 3,4 |
| <i>S. denticarpum</i> | н/о | 11,2 | 40,1 | 15,9 | 38,7 | 5,3 | 0,0 |
| <i>S. mcClurei</i> | н/о | 2,8 | 38,5 | 4,2 | 33,1 | 3,6 | 20,6 |
| <i>S. polycystum</i> | н/о | 32,1 | 32,4 | 12,6 | 35,3 | 8,5 | 11,2 |

¹ н/о – не определяли.

и галактозы (*U. pinnatifida*, *S. swartzii*, *S. oligocystum*, *S. denticarpum*, *S. mcClurei*, *S. polycystum*).

Обработка клеток DLD-1 и HT-29 фукоиданом из *L. cichorioides* в концентрации до 200 мкг/мл не приводила к торможению их роста и не сопровождалась массовой гибелью (рис. 1). Аналогичные результаты получены при использовании и других фукоиданов. В дальнейших экспериментах все препараты фукоиданов использовали в дозе 50 мкг/мл.

Торможение роста колоний в клетках DLD-1, обработанных фукоиданом в дозе 50 мкг/мл, составило более 50% для фукоиданов, выделенных из *L. cichorioides*, *L. japonica*. Фукоиданы из *F. evanescens*, *U. pinnatifida*, *S. polycystum* и *S. oligocystum* ингибировали рост колоний от 50 до 70%. Слабое ингибирование до 20% показали фукоиданы из *S. swartzii*, *S. mcClurei*, *S. denticarpum* (рис. 2, а).

Наиболее значительные показатели торможения роста колоний для клеточной линии HT-29 были получены при обработке их фукоиданами из *L. cichorioides* и *S. polycystum*: в 2 раза по сравнению с контролем. Слабое ингибирование роста колоний фукоиданами из *S. swartzii*, *S. mcClurei*, *S. denticarpum* было аналогично их действию на клетки DLD-1. Обработка фукоиданами из *S. oligocystum*, *F. evanescens*, *U. pinnatifida* и *L. japonica* клеточной линии HT-29 приводила к снижению количества колоний от 60 до 70% (рис. 2, б). Сопоставление противоопухолевой активности 9 исследованных фукоиданов, собранных в разных регионах, позволило выявить среди них как высокоактивные ингибиторы роста колоний клеток рака кишечника, так и фукоиданы, практически не проявляющие противоопухолевого действия.

Обсуждение полученных данных. Различия в противоопухолевой активности между фукоиданами из различных источников обусловлены, по-видимо-

му, особенностями их структуры. Исследуемые соединения отличаются друг от друга по типу гликозидных связей, моносахаридному составу, степени сульфатирования, молекулярной массе. Ранее на клеточной линии JB6 Cl41 нами было показано, что фукоиданы из *L. cichorioides* и *L. gurianovae* обладают более сильным ингибированием процесса трансформации клеток мыши JB6 Cl41 под действием эпидермального фактора роста по сравнению с фукоиданом из *F. evanescens*. Возможно, для проявления превентивного действия фукоиданов необходимо присутствие 1,3-связанной α-L-фукозы. В настоящем исследовании фукоиданы из *L. cichorioides* и *L. japonica* проявили наиболее выраженное противоопухолевое действие. Другие соединения, такие как фукоиданы из *S. swartzii*, *S. denticarpum* и *S. mcClurei*, практически не обладали противоопухолевой активностью.

Вероятно, противоопухолевая активность фукоиданов зависела от строения главной цепи молекулы. Об этом говорит тот факт, что фукоидан из *L. cichorioides*, проявивший наибольшую активность, содержал главную цепь, построенную только из α-1,3-связанной фукозы. Фукоиданы из *F. evanescens* и *U. pinnatifida*, активность которых была меньше, построены из 1,3- и 1,4-связанных остатков α-L-фукопиранозы и чередующихся 1,3- и 1,4-связанных остатков α-L-фукопиранозы и галактозы соответственно.

Таким образом, все исследованные полисахариды были нетоксичны в концентрации до 200 мкг/мл. В наших экспериментах на модели мягких агаров впервые показано, что фукоиданы из *F. evanescens*, *L. japonica*, *L. cichorioides*, *U. pinnatifida*, *S. oligocystum* и *S. polycystum* обладают противоопухолевой активностью по отношению к клеткам рака кишечника человека DLD-1 и HT-29.

Полученные данные могут представлять несомненный интерес, поскольку соединения, обладающие низкой токсичностью и проявляющие биологическую активность, находят применение в медицине [13]. Использование фукоиданов как ингибиторов роста колоний в нетоксических дозах может оказаться

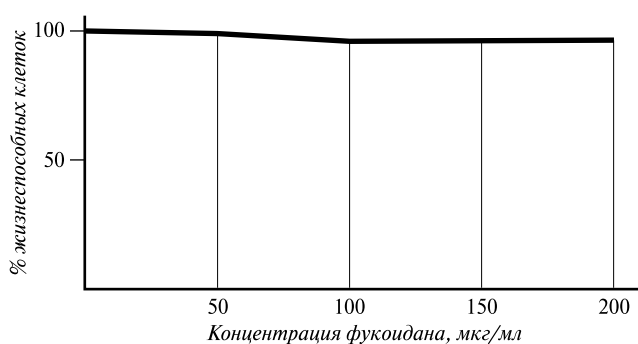


Рис. 1. Жизнеспособность клеток DLD-1 и HT-29, обработанных фукоиданом.

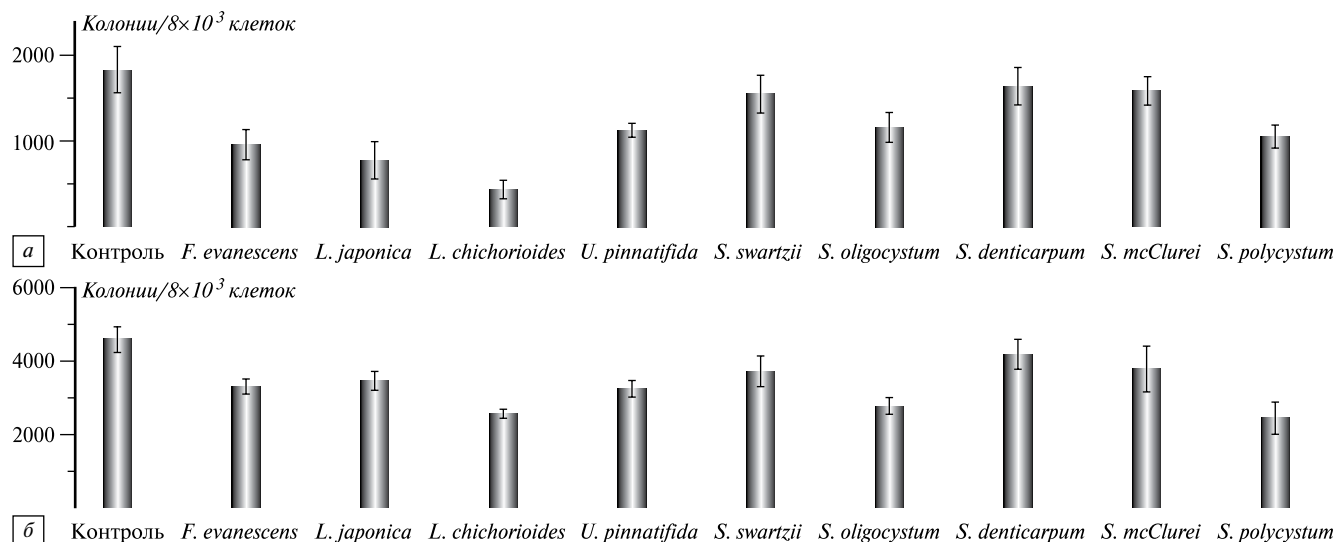


Рис. 2. Ингибирующее действие фукоиданов на рост колоний клеток рака кишечника человека DLD-1 (а) и HT-29 (б).

перспективным для предотвращения и лечения раковых заболеваний. Задачами нашей дальнейшей работы является исследование взаимосвязи между структурными особенностями фукоиданов и их противоопухолевым действием.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 09-04-00761-а, № 09-04-90312-Вьет_а и программы «Молекулярная клеточная биология».

Литература

- Кузнецова Т.А., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н. и др. Биологическая активность фукоиданов из бурых водорослей и перспективы их применения // Антибиотики и химиотерапия. 2004. Т. 49, № 5. С. 24–27.
- Лапикова Е.С., Дрозд Н.Н., Толстенков А.С. и др. Ингибирование тромбина и фактора Ха фукоиданом из *Fucus evanesces* и его модифицированными аналогами // Бюл. эксп. биол. и мед. 2008. Т. 146, № 9. С. 304–309.
- Чертков К.С., Давыдова С.А., Нестерова Т.А. и др. Эффективность полисахарида транслама как средства раннего лечения острой лучевой болезни // Радиационная биология. Радиоэкология. 1999. Т. 39. С. 572–577.
- Шевченко Н.М., Кусайкин М.И., Урванцева и др. Способ комплексной переработки бурых водорослей с получением препаратов для медицины и косметологии // Патент RU 2240816. 2004. БИ 33. С. 444–445.
- Colburn N.H., Wendel E.J., Abruzzo G. Dissociation of mitogenesis and late-stage promotion of tumor cell phenotype by phorbol esters: mitogen-resistant variants are sensitive to promotion // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. Vol. 78. P. 6912–6916.
- Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds // Glycobiology. 2007. Vol. 17. P. 541–552.
- Dodgson K.S., Price, R.G. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides // Biochem. J. 1962. Vol. 84. P. 106–110.
- Dubois M., Gilles K., Hamilton J.K., Rebers P.A. et al. A colorimetric method for the determination of sugars // Nature. 1951. Vol. 168. P. 167.
- Haroun-Bouhedja F., Ellouali M., Sinquin C. et al. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans // Braz. J. Med. Biol. 2000. Vol. 100. P. 453.
- Kikunaga S., Miyata Y., Ishibashi G. et al. The bioavailability of magnesium from Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Hijiki (*Hijikia fusiforme*) and the effect of alginic acid on magnesium utilization of rats // Plant Foods Hum. Nutr. 1999. Vol. 53. P. 265–274.

- Lee N.Y., Ermakov, S.P., Zvyagintsev, T.N. et al. Inhibitory effects of fucoidan on activation of epidermal growth factor receptor and cell transformation in JB6 Cl41 cells // Food Chem. Toxicol. 2008. Vol. 46. P. 1793–1800.
- Lee N.Y., Ermakova S.P., Choi H.K. et al. Fucoidan from *Laminaria cichorioides* inhibits AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cells // Mol. Carcinog. 2008. Vol. 47. P. 629–637.
- Li B., Lu F., Wei X., Zhao R. Fucoidan: structure and bioactivity // Molecules. 2008. Vol. 13. P. 1671–1695.
- Nishino T., Aizu Y., Nagumo, T. The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity // Thromb. Res. 1991. Vol. 64. P. 723–731.
- Zhongcun P., Kodo O., Takashi M. Structure of b-glucan oligomer from laminarin and its effect on human Monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2005. Vol. 69. P. 553–558.

Поступила в редакцию 06.04.2009.

ANTICANCER ACTIVITY OF BROWN ALGAE-DERIVED FUCOIDANS

O.S. Vischuk¹, S.P. Ermakova², Fam Dyuk Tin³, N.M. Shevchenko², Bui Ming Li³, T.N. Zvyagintseva²
¹ Far Eastern National University (27 Oktyabrskaya St. Vladivostok 690950 Russia), ² Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100-Anniversary Av. Vladivostok 690022 Russia), ³ Nha Trang Institute of Technological Studies and VANT Application (2 Hungvuong St. Nha Trang Vietnam)
 Summary – The authors have studied anticancer activities of fucoidans derived from nine brown algae species using the soft agar-agar model. As shown, the fucoidans are non-toxic to DLD-1 and HT-29 cells in concentrations of up to 200 µg/mL. The fucoidan extracted from *Laminaria cichorioides* and composed of 1.3-tie molecules α-L-fucose tends to inhibit growth of cancer cell colonies in bowels. The low sulphated fucogalactans derived from *Sargassum swartzii*, *S. mcClurei* and *S. denticarpum* do not really exhibit anticancer properties. The findings allowed considering application of the brown algae-derived fucoidans (Far Eastern seas) as very promising in effort to prevent and treat oncological diseases.

Key words: fucoidans, brown algae, anticancer activity.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 86–89.