

ВЛИЯНИЕ ФУКОИДАНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДОРΟΣЛЕЙ *LAMINARIA DIGITATA* И *FUCUS VESICULOSUS*, НА КЛЕТКИ HeLa G-63, ECV 304 И PC 12

© Е. В. Журишкина,¹ И. М. Лапина,¹ Д. Р. Иванен,¹ С. И. Степанов,¹ С. В. Швецова,^{1, 2}
А. Л. Шаварда,³ Н. Я. Гильяно,¹ А. А. Кульминская^{1, 2}

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, 188300,

² С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251,

и ³ Ресурсный центр «Развитие молекулярных и клеточных технологий»

С.-Петербургского государственного университета, 199034;

^{1, 2} электронный адрес: kulm@omrb.pnpi.spb.ru

В настоящей работе изучали цитотоксическое действие фукоиданов на клетки млекопитающих. Три различные фракции фукоиданов (F1, F2 и F3) были выделены из измельченных водорослей *Laminaria digitata* и *Fucus vesiculosus*. Сравнение их воздействия на клетки HeLa G-63 показало, что фракция F2, обладающая повышенным содержанием сульфатов, имеет наибольшую биологическую активность, поэтому она была выбрана для дальнейшего изучения ее действия на клетки линий HeLa G-63, ECV 304 и PC 12. Было показано, что фракция фукоидана F2 ингибирует пролиферацию и вызывает гибель клеток в зависимости от дозы и времени обработки. Наиболее чувствительными к действию F2 оказались клетки нейроэндокринной опухоли крысы PC 12, наименее — эндотелиальные клетки человека ECV 304.

Ключевые слова: фукоидан, пролиферация, проточная цитометрия.

Последнее десятилетие отмечено ростом количества работ, посвященных полисахаридам, источником которых являются различные виды морских водорослей и беспозвоночных. Сульфатированные полисахариды, получаемые из бурых водорослей, обозначают термином «фукоиданы». Они имеют разветвленную структуру и помимо фукозы и сульфогрупп могут содержать другие моносахариды в различных соотношениях (маннозу, галактозу, глюкозу, ксилозу и т. д.), уроновые кислоты и ацетильные группы (Holtkamp et al., 2009; Morua et al., 2012). Большой интерес к фукоиданам обусловлен необычайно широким спектром их биологической активности: антивирусной (Mandal et al., 2007; Trincherо et al., 2009), антибактериальной (Marudhupandi, Kumar, 2013), антикоагулянтной (Nishino et al., 1991; Cumashi et al., 2007; Chandia, Matsuhira, 2008), иммуностимулирующей (Wang et al., 1994; Kima, Joo, 2008), противовоспалительной (Matsuyama et al., 2005; Cumashi et al., 2007) и противоопухолевой (Li et al., 2008; Holtkamp et al., 2009; Yamasaki-Miyamoto et al., 2009; Senthilkumar et al., 2013). Все это позволяет отнести их к поливалентным биомодуляторам.

Значительно выросло число работ, посвященных исследованию противоопухолевой активности фукоиданов, выражающейся в индукции апоптоза в раковых клетках (Aisa et al., 2005; Yamasaki-Miyamoto et al., 2009; Ale et al., 2011a; Costa et al., 2011; Zhang, 2013). Ряд работ демонстрирует задержку фукоиданом роста клеток в определенной фазе их клеточного цикла (Riou et al., 1996; Naneji et al., 2005; Fukahory et al., 2008; Nagamine et al., 2009). Помимо ярко выраженного противоопухолевого

действия, показанного *in vitro* на клеточных линиях, привлекательность фукоиданов для применения в онкотерапии обусловлена их предполагаемой биосовместимостью и низкой токсичностью для нормальных клеток. Однако исследований, аргументированно подтверждающих низкое цитотоксическое действие фукоиданов на нормальные клетки, пока немного, особенно по сравнению с большим числом работ, посвященных их противоопухолевым свойствам. Так, показано, что при культивировании нормальных клеток эпителия молочной железы (НМЕС) в присутствии фукоидана в различных концентрациях изменений пролиферации нет (Yamasaki-Miyamoto et al., 2009). В другой работе приведены данные о том, что фукоиданы нетоксичны по отношению к эпидермальным клеткам мыши JB6 Cl41 (Vishchuk et al., 2012).

В общем, внедрение фукоиданов в медицину задерживается и пока пребывает на стадии изучения их свойств и механизмов действия, тогда как в косметологии уже широко применяют полисахариды из бурых водорослей (Kim et al., 2011; Morua et al., 2012).

Целью нашей работы было проверить биологическую активность сульфатированных полисахаридов, выделенных по известным методикам из коммерчески доступных измельченных водорослей *Laminaria digitata* и *Fucus vesiculosus*, используемых в косметических процедурах. Для оценки их влияния на пролиферацию и митотический цикл клеток мы выбрали три клеточные линии — клетки карциномы человека HeLa G-63, эндотелиоциты человека линии ECV 304 и клетки нейроэндокринной опухоли крысы PC 12.

Состав фракций фукоиданов F1, F2 и F3

Фракция фукоиданов	Нейтральные моносахариды, %				Уроновые кислоты, %	Сульфаты, % от общей массы	Белок, % от общей массы
	фукоза	ксилоза	галактоза	манноза			
F1	36.0 ± 2.2	1.2 ± 0.1	8.3 ± 0.6	11.7 ± 0.3	5.6 ± 0.4	25.0 ± 2	НО
F2	25.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	8.2 ± 0.5	13.2 ± 0.4	НО	33.6 ± 1.4	0.40 ± 0.03
F3	57.7 ± 1	2.3 ± 0.2	6.5 ± 0.4	17.1 ± 0.4	5.6 ± 0.4	25.0 ± 2	НО

Примечание. НО — не определено.

Материал и методика

Источником фукоидана служили механически измельченные бурые водоросли *L. digitata*, приобретенные в компании «Верина» (Санкт-Петербург), и смесь водорослей *L. digitata* и *F. vesiculosus* (в равной пропорции) (ООО «Исцеление»). Все реактивы были приобретены в компаниях Sigma-Aldrich и Acros Organics (США), если не указано иное, среда Игла — в фирме ICN (США), эмбриональная сыворотка и раствор Версена приобретены в фирме Биолот.

Клетки. Эндотелиоциты человека (линия ECV 304) и клетки нейроэндокринной опухоли крысы (линия PC 12) были получены из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки карциномы человека (линия HeLa G-63) культивируются в лаборатории нашего института (ПИЯФ НИЦ «Курчатовский институт») с 1963 г. Клетки культивировали во флаконах Карреля в среде Игла MEM (с L-глутамином и двойным набором аминокислот), содержащей 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота и 1 % смеси пенициллина и стрептомицина (Биолот, Санкт-Петербург), при 37 °С. Для построения кривых роста клеток HeLa G-63 их выращивали в течение 24 ч, затем в культуральную среду добавляли различные фракции фукоидана в концентрации 100 мкг/мл и далее культивировали в течение 96 ч, ежедневно считая клетки в камере Горяева. На графике (рис. 1) представлены результаты трех независимых опытов.

Получение и анализ фракций фукоидана. Фракция фукоидана F1 была выделена из водорослей *L. digitata*, а фракция F2 — из смеси *L. digitata* и *F. vesiculosus* (1 : 1). Образцы F1 и F2 представляли собой грубые фракции сульфатированных полисахаридов, выделенных по методике, описанной ранее (Bilan et al., 2010), без дополнительного фракционирования с помощью ионно-обменной хроматографии. Фракцию F3 получали с помощью дополнительного фракционирования фракции F1 на колонке с анионообменным носителем DEAE-Sephacel и элюирования 1.5 М раствором NaCl. Моносахаридный состав фракций фукоиданов определяли методом хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) триметилсилильных производных соответствующих метоксидов после кислотного гидролиза образцов раствором трифторуксусной кислоты по описанной методике (Билан и др., 2007). Лиофилизованные пробы растворяли в пиридине и добавляли к ним раствор метоксиламина в пиридине (20 мг/мл). Виалы с реакционной смесью выдерживали при комнатной температуре в течение 40 мин, затем в них добавляли силилирующий агент (бис-триметилсилилтрифторацетамид), после чего виалы выдерживали при

100 °С в течение 15 мин. Далее проводили хроматографический анализ и обработку полученных данных (по: Muravnik, Shavarda, 2012). Содержание сульфатных остатков в изучаемых полисахаридах определяли с помощью турбидиметрического метода (Dodgson, 1961; Dodgson, Price, 1962) после кислотного гидролиза образцов одномолярным раствором HCl при 100 °С в течение 6 ч. В качестве стандарта использовали K₂SO₄. Содержание белка определяли по методу Брэдфорда (Bradford, 1976), стандартом служил бычий сывороточный альбумин (БСА). Состав всех трех образцов представлен в табл. 1.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла проводили на проточном цитометре, созданном в группе радиобиологии и медицины Петербургского института ядерной физики (Stepanov et al., 1996). Через 24—72 ч после добавления фукоидана клетки снимали раствором Версена, центрифугировали при 700 об/мин в течение 5 мин и полученную суспензию окрашивали раствором бромистого этидия (50 мкг/мл) в течение 30 мин при 37 °С (Fried et al., 1978). Анализ гистограмм (процентное соотношение клеток с различным содержанием ДНК к общему числу проанализированных клеток) проводили с помощью модифицированной компьютерной программы (на основе: Dean et al., 1982). В каждой пробе анализировали не менее 20 тыс. клеток.

Апоптотические клетки выявляли с помощью специального набора реактивов FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen, США). Клетки выращивали 24 ч, затем добавляли фукоидан в концентрации 60 мкг/мл и культивировали в течение 30 ч. Затем проводили комбинированное окрашивание аннексином-FITC и йодидом пропидия в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Анализ проводили на цитофлуориметре Cell Lab Quanta Sc (Beckman Coulter, США). Каждый эксперимент повторяли трижды. Количество апоптотических клеток определяли как долю клеток, окрашенных аннексином V, но не окрашенных йодидом пропидия. В каждой пробе анализировали не менее 20 тыс. клеток.

Митотический индекс, а также морфологические изменения клеток, выращенных на покровных стеклах и обработанных фукоиданом, определяли с помощью светового микроскопа Leica DM 2500 (Leica Microsystems, Германия, Швейцария). Через 24, 48 и 72 ч после добавления фукоидана в различных концентрациях клетки фиксировали 96%-ным этанолом, затем окрашивали ацетоорсеином и на полученных препаратах определяли число митозов и митотический индекс (отношение делящихся клеток к общему числу клеток, %).

Цитотоксичность фукоидана оценивали с помощью МТТ-теста. Недифференцированные клетки

всех трех линий рассевали в 96-луночные планшеты Cell+ (Sarstedt, Германия) (7000 клеток на 1 лунку) и выращивали во влажной атмосфере при 5 % CO₂ при 37 °С. Через 24 ч культивирования в питательную среду вносили фукоидан F2 в концентрациях 20, 40, 60 и 80 мкг/мл. Через 48 ч в среду добавляли 10 мкМ раствора МТТ (5 мг/мл) (Sigma, США) и выдерживали 4 ч. Для растворения кристаллов образовавшегося формазана в лунки добавляли по 100 мкМ 20%-ного додецилсульфата натрия в 50%-ном диметилформамиде и помещали планшет на шейкер (200 об/мин) на 3 ч при 37 °С. Эксперимент повторяли трижды с положительными и отрицательными контролями. Оптическую плотность полученных растворов в лунках измеряли при длине волны 595 нм с помощью иммуноферментного планшетного фотометра ЭФОС-9305 (Сапфир, Россия). Результаты оценивали по оптической плотности содержимого экспериментальной и контрольной лунок (при длине волны поглощения 595 нм). Долю погибших клеток (индекс цитотоксичности, IC, %) рассчитывали по формуле $IC = ((K - O)/K) \cdot 100 \%$, где K — контроль; O — эксперимент.

Для статистической обработки данных, построения графиков и диаграмм использовали программы Excel 2010 и OriginPro 8. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Влияние различных фракций фукоидана на клетки HeLa G-63. Кривые скорости роста клеток в присутствии фракции фукоидана F1, F2 или F3 показывают, что только фракция F2 существенно ингибирует пролиферацию клеток (рис. 1). По данным проточной цитометрии, обработка клеток фракцией F1, F2 или F3 в концентрации 100 мкг/мл в течение 24 ч приводила к увеличению погибших клеток на 11, 9 и 14 % соответственно по сравнению с контролем (рис. 2, а). Однако через 48 ч действия F2 доля погибших клеток превосходила контрольное значение на 49 %, тогда как для фракций F1 и F3 разница с контролем составляла 12 и 6 % соответственно. При концентрации фукоидана 300 мкг/мл наибольшая эффективность фракции F2 наблюдалась уже после

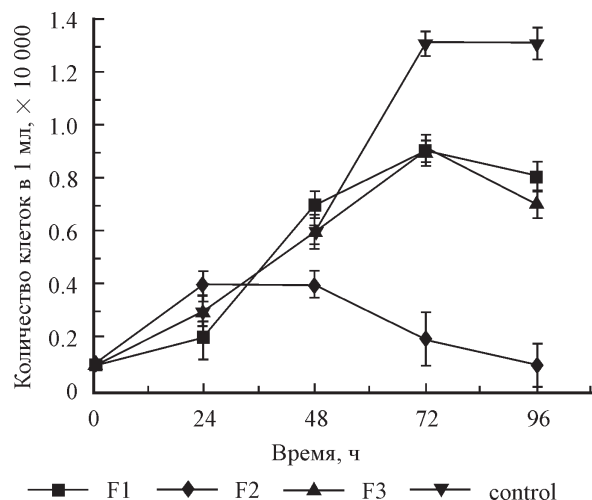


Рис. 1. Кривые скорости роста клеток HeLa G-63 при культивировании в присутствии фракции фукоидана F1, F2 или F3 в концентрации 100 мкг/мл.

24-часовой обработки: доля погибших клеток превышала контрольное значение на 75 % (а для фракций F1 и F3 — на 26 и 42 % соответственно). При увеличении времени обработки клеток до 72 ч различия в действии фракций фукоидана снижались.

Обработка клеток фукоиданом в концентрации 100 мкг/мл приводила к изменению митотической активности клеток, причем только фракция F2 обладала ингибирующим эффектом (табл. 2). Таким образом, из трех исследованных фракций фукоидана для следующих экспериментов мы выбрали фракцию F2 как наиболее цитотоксичную для клеток линии HeLa G-63.

Влияние фракции фукоидана F2 на другие клетки. В дополнение к HeLa G-63 были взяты две клеточные линии — эндотелиоциты человека (линия ECV 304) и клетки нейроэндокринной опухоли крысы (линия PC 12). Цитотоксичность фукоидана F2 выявляли с помощью МТТ-теста после 48-часового присутствия его в среде. Фукоидан F2 угнетает выживаемость клеток HeLa G-63 во всех испытанных концентрациях (рис. 3). В отношении клеток PC 12 и ECV 304 ингибирующий эф-

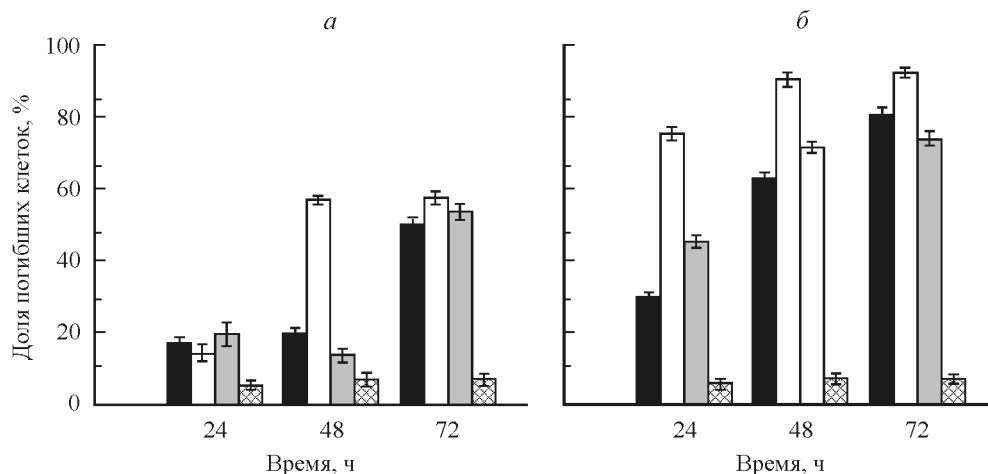


Рис. 2. Влияние фракции фукоидана F1, F2 или F3 в концентрациях (100 (а) и 300 (б) мкг/мл на гибель клеток HeLa G-63 в течение 72 ч.

Столбцы: черные — фракция F1, белые — F2, серые — F3, заштрихованные — контроль.

Таблица 2
Влияние фракций фукоидана F1, F2 и F3
на митотическую активность клеток HeLa G-63

Время действия, ч	Митотический индекс, ‰			
	контроль	фракции фукоидана		
		F1	F2	F3
24	21.5 ± 2.2	27.0 ± 4.4	23.2 ± 3.8	37.5 ± 4.2
48	20.0 ± 3.6	26.5 ± 4.4	17.0 ± 2.6	25.5 ± 4.4
72	20.0 ± 3.2	25.8 ± 3.8	12.0 ± 2.5 ^a	38.0 ± 4

Примечание. Даны средние значения и их среднеквадратичная ошибка. ^a Достоверность различия с контролем при $P < 0.1$.

эффект фукоидана F2 проявлялся с концентрации 60 мкг/мл. По данным цитофлуориметрического анализа, культивирование клеток каждой линии в присутствии фракции F2 в диапазоне концентраций от 20 до 80 мкг/мл приводило к гибели клеток в зависимости от дозы F2 и времени обработки (рис. 4). Клетки опухоли крысы PC 12 оказались наиболее, а эндотелиальные клетки ECV 304 — наименее чувствительными к действию фукоидана F2 (рис. 4).

Для выяснения вопроса о том, вызывает ли фракция F2 (60 мкг/мл) индукцию апоптоза в клетках всех линий, был проведен анализ с помощью двойного окрашивания аннексином V-FITC и йодидом пропидия. Результаты, представленные на рис. 5, показали, что число апоптотических клеток (позитивных по аннексину

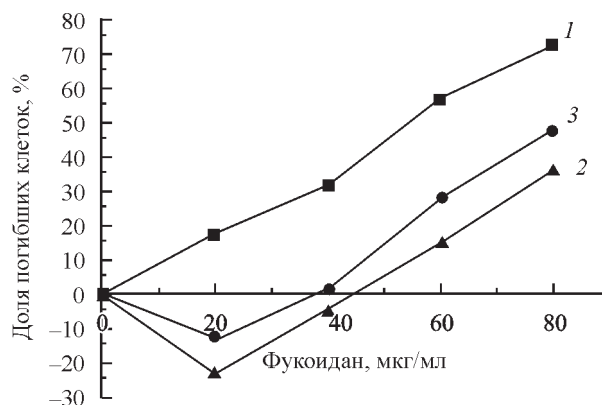


Рис. 3. Цитотоксичность фракции фукоидана F2 в отношении клеток линий HeLa G-63 (кривая 1), ECV 304 (2) и PC 12 (3). Результаты МТТ-теста.

V-FITC и негативных по PI) значительно возрастает при 30-часовом культивировании с F2 в клетках PC 12 (с 2.18 до 20.39 %) и в клетках HeLa G-63 (с 3.08 до 18.9 %, рис. 5, а, б), но умеренно — в клетках ECV 304 (с 1.82 до 3.88 %, рис. 5, в).

На рис. 6 видны признаки апоптотической гибели клеток через 30 ч после добавления фракции фукоидана F2 в концентрации 60 мкг/мл в питательную среду — маргинация и пикноз хроматина, неровность контуров ядра, изменение контуров и фрагментация клеток.

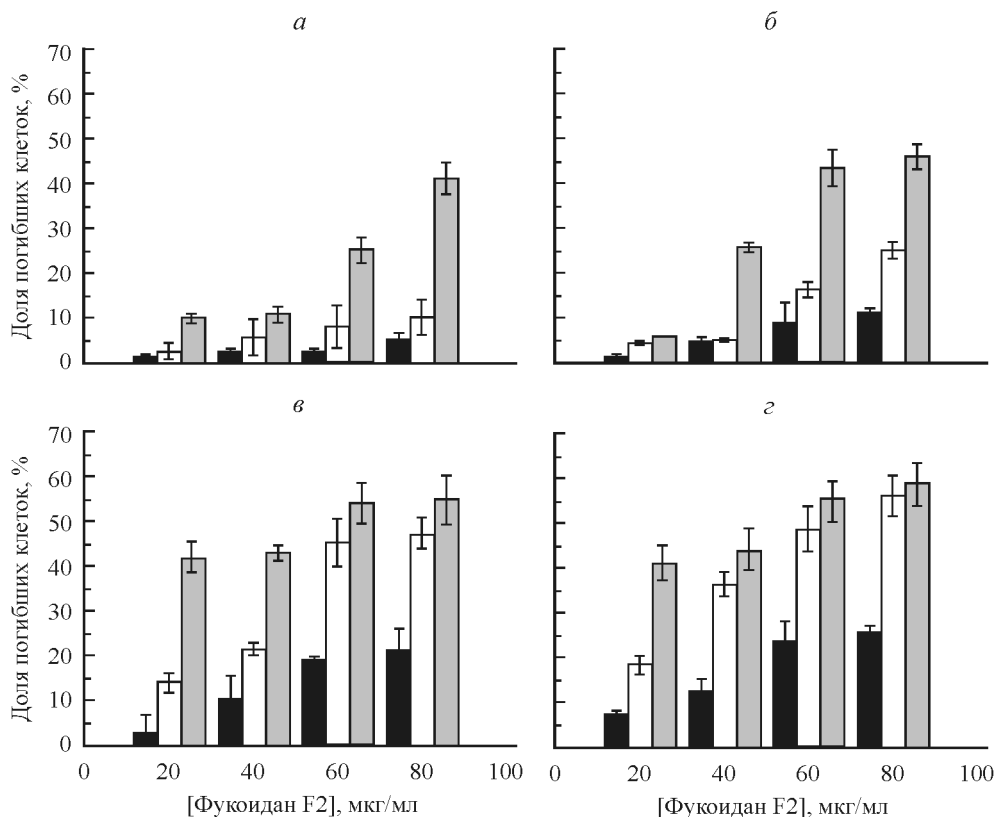


Рис. 4. Сравнительная оценка цитотоксического влияния фукоидана F2 на клетки линий HeLa G-63, ECV 304 и PC 12.

Столбцы: черные — клетки ECV 304, белые — HeLa G-63, серые — PC 12. Показано процентное соотношение погибших клеток к общему числу проанализированных после обработки фукоиданом F2 в дозах от 20 до 80 мкг/мл в течение 24 (а), 30 (б), 48 (в) и 72 (г) ч (контрольные значения вычитали).

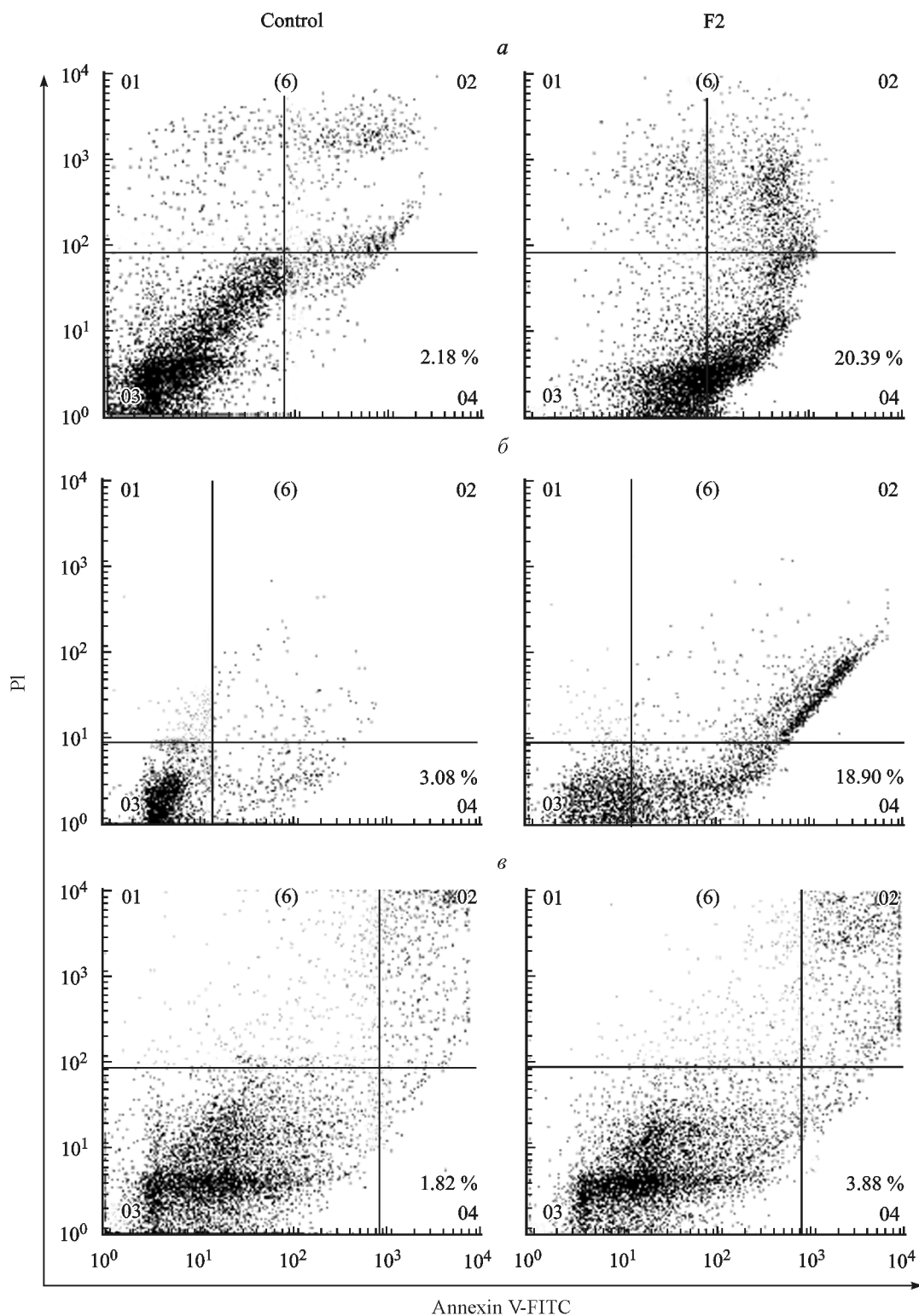


Рис. 5. Распределение апоптотических и жизнеспособных клеток PC 12 (а), HeLa G-63 (б) и ECV 304 (в) в режиме DotPlot (двухмерная гистограмма).

По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции аннексина V-FITC, отн. ед.; по оси ординат — интенсивность флуоресценции PI, отн. ед.; 1-й квадрант — клетки, негативные по аннексину V-FITC и позитивные по PI (некротические); 2-й квадрант — клетки, позитивные по PI и аннексину V-FITC (поздняя стадия апоптоза или некроз); 3-й квадрант — клетки, негативные по PI и аннексину V-FITC (жизнеспособные); 4-й квадрант — клетки, позитивные по аннексину V-FITC и негативные по PI (ранняя стадия апоптоза, доля указана цифрой).

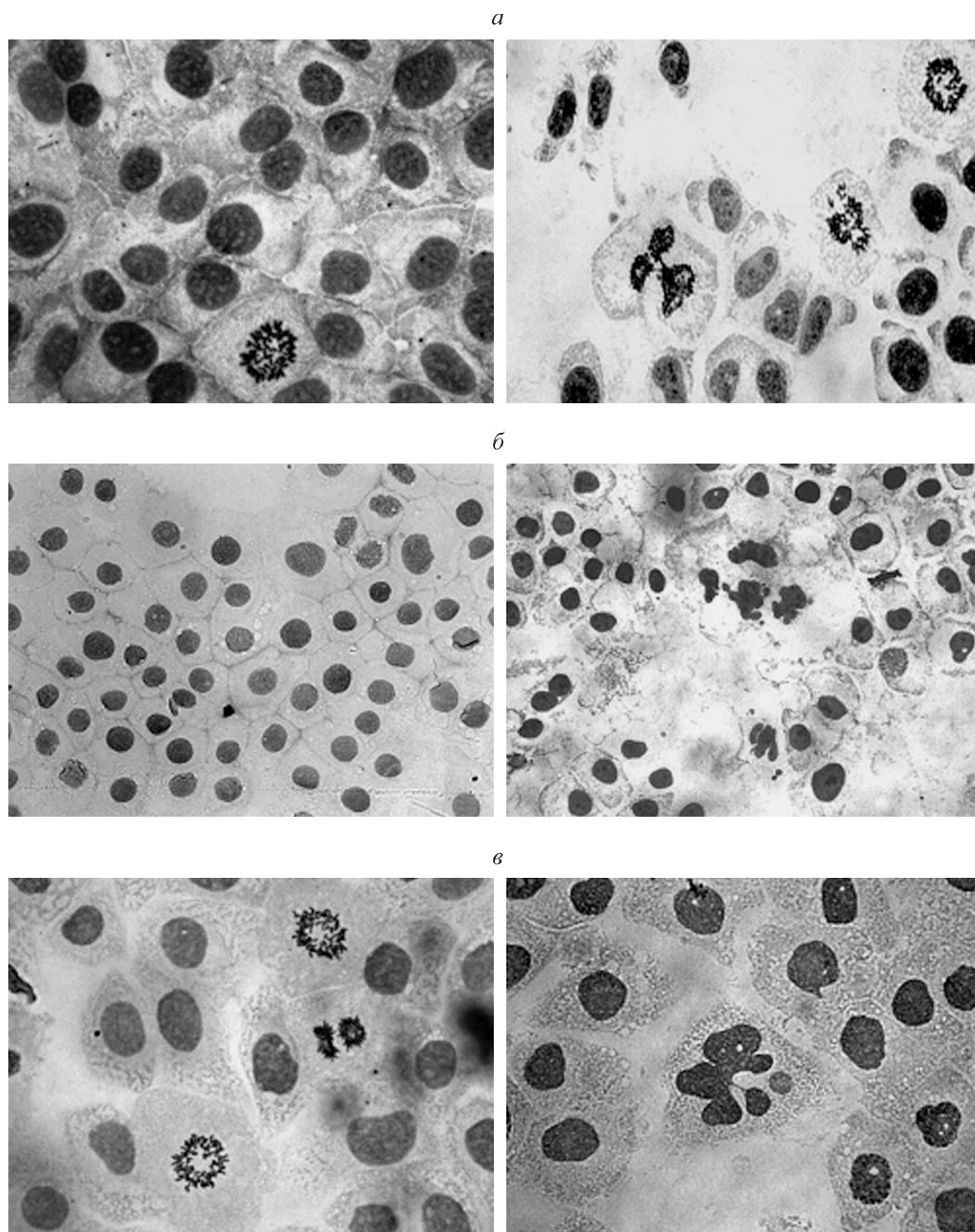


Рис. 6. Морфологические изменения клеток HeLa G-63 (а), PC-12 (б) и ECV-304 (в) после 30-часового действия фракции фукоидана F2 в концентрации 60 мкг/л.

Левая колонка — контроль; правая — F2. Об. 40×.

Влияние фракции фукоидана F2 на клеточный цикл. Цитофлуориметрический анализ распределения клеток всех трех линий по фазам клеточного цикла проводили после 24-, 30- и 48-часового культивирования в присутствии фракции F2 в концентрации 60 мкг/мл. При этом для клеток HeLa G-63 нарушений прогрессии клеток по фазам клеточного цикла не наблюдали (табл. 3). Таким образом, фукоидан F2 не оказывает влияния на клеточный цикл HeLa G-63. Клетки PC 12, по-видимому, оказались более чувствительными к дей-

ствию фукоидана, и после 30-часовой обработки F2 число клеток в фазе G_1 увеличивалось на 15.2 %. В клетках линии ECV 304 число клеток в фазе G_1 после действия F2 в течение 24, 30 и 48 ч повышалось по сравнению с контролем соответственно на 4.3, 10.1 и 9.8 % (табл. 3). Нарушение прогрессии по циклу заметнее всего проявилось на клетках линии ECV 304, возможно потому, что у этих клеток система контроля прогрессии по циклу выражена в большей степени, чем у опухолевых клеток (Гильяно и др., 2008).

Таблица 3

Распределение клеток HeLa G-63, PC 12 и ECV 304 по фазам клеточного цикла после действия фракции фукоидана F2 (60 мкг/мл) в течение разного времени

Время действия, ч	Фаза цикла	Линия клеток					
		HeLa G63		PC 12		ECV 304	
		контроль	F2	контроль	F2	контроль	F2
24	G ₁	57.4 ± 1.1	56.3 ± 0.9	64.6 ± 1.2	66.2 ± 1.6	44.3 ± 1.5	48.6 ± 0.9 ^a
	S	9.4 ± 1.0	12.2 ± 1.4	8.8 ± 0.4	9.0 ± 0.5	18.3 ± 0.9	14.2 ± 0.6 ^a
	G ₂ /M	33.1 ± 1.6	31.5 ± 0.9	26.6 ± 1.3	24.8 ± 1.5	37.5 ± 1.7	37.2 ± 0.5
30	G ₁	61.0 ± 1.5	57.3 ± 0.7	53.8 ± 1.7	69.0 ± 1.8 ^a	57.3 ± 2.4	67.4 ± 4.3 ^b
	S	16.3 ± 1.2	13.8 ± 1.1	18.6 ± 1.5	10.2 ± 1.7 ^a	14.0 ± 1.5	7.8 ± 1.2 ^a
	G ₂ /M	22.7 ± 0.7	29.0 ± 0.6	27.6 ± 1.8	20.8 ± 0.5 ^a	28.8 ± 1.3	24.8 ± 3.6
48	G ₁	59.4 ± 2.7	58.5 ± 0.5	67.5 ± 1.5	70.0 ± 2.7	54.8 ± 1.5	64.6 ± 2.4 ^a
	S	8.4 ± 0.7	8.3 ± 0.5	9.5 ± 1.2	6.3 ± 0.3 ^a	14.2 ± 0.7	9.4 ± 0.5 ^a
	G ₂ /M	32.2 ± 2.5	33.3 ± 0.5	23.0 ± 1.5	23.7 ± 2.6	31.0 ± 1.9	26.0 ± 2.9

Примечание. Даны средние значения и их среднеквадратичная ошибка; достоверность различия с контролем при $P < 0.05$ (^a) или $P < 0.1$ (^b).

Обсуждение

Мы исследовали цитотоксическое действие различных фракций фукоидана, выделенных из коммерчески доступных бурых водорослей по известным методикам (Bilan et al., 2010), на клетки различных линий. Выбор именно таких источников фукоидана был обусловлен широким применением этих видов водорослей в косметологии и в качестве биологически активных добавок. Нас интересовал вопрос о том, насколько цитотоксичен содержащийся в них фукоидан. Все три фракции различались по составу. Так, во фракции F2 (фукоидан, выделенный из смеси *L. digitata* и *F. vesiculosus*) повышено содержание сульфатов, а во фракциях F1 и F3, полученных из *L. digitata*, присутствуют урсоловые кислоты; кроме того, фракции различались по содержанию фукозных остатков (табл. 1). По данным из литературы, степень сульфатирования молекул фукоидана коррелирует с их биологической активностью (Ale et al., 2011b). В нашем случае эта зависимость также оказалась очевидной: наибольший эффект при сравнительном воздействии фракций на клеточную линию HeLa G-63 был выявлен у фракции F2 (рис. 1, 2; табл. 2).

Мы исследовали действие фракции фукоидана F2 на клетки линий HeLa G-63, эндотелиоцитов человека (линия ECV 304) и на клетки нейроэндокринной опухоли крысы (линия PC 12). Оказалось, что F2 ингибирует пролиферацию (рис. 3), а также индуцирует гибель клеток в зависимости от дозы и времени обработки (рис. 4). Эти результаты совпадают с результатами других авторов (Yamasaki-Miyamoto et al., 2009; Costa et al., 2011), которые изучали влияние фукоидана на пролиферацию клеток HeLa и MCF-7 соответственно. Интересно, что в отличие от нормальных клеток, для которых фукоидан был нетоксичен (Yamasaki-Miyamoto et al., 2009; Vishchuk et al., 2012), наши клетки ECV 304 оказались восприимчивы к действию фукоидана F2, хотя и в значительно меньшей степени, чем другие клетки, исследуемые нами. Многочисленные морфологические, иммунохимические и биохимические исследования, а также проведенная цитогенетическая характеристика показали, что клетки ECV 304

могут быть использованы в качестве эндотелиальной клеточной модели для решения ряда медико-биологических задач (Hughes, 1996; Гильяно и др., 2008; Ярцева, Федорцева, 2008). Например, они могут быть объектом инфицирования вирусом JEV наряду с другими эндотелиальными клетками (Shwetank, 2013).

Во множестве публикаций, посвященных изучению противоопухолевой активности фукоиданов, утверждается, что фукоидан индуцирует именно апоптотическую гибель клеток (Aisa et al., 2005; Yamasaki-Miyamoto et al., 2009; Ale et al., 2011a; Costa et al., 2011; Zhang, 2013). С помощью проточной цитометрии мы подтвердили, что фукоидан F2 вызывает апоптоз в клетках PC 12, HeLa G-63 и в меньшей степени ECV 304 (рис. 5).

Известно, что антиканцерогенное действие фукоидана зависит от вида опухоли. На примере 15 различных клеточных линий (Fukahory et al., 2008) было показано, что при культивировании клеток с фукоиданом, выделенным из *Cladosiphon okamuranus*, подавление клеточной пролиферации более выражено в линиях гепатоцеллюлярной карциномы, холангиокарциномы и карциномы желчного пузыря, чем в линиях нейробластомы, гепатобластомы и карциномы яичников. В нашей работе наиболее чувствительной к действию фукоидана F2 оказалась клеточная линия нейроэндокринной опухоли крысы (PC 12) (рис. 4).

Фукоидан F2 вызывает аккумуляцию клеток ECV 304 в фазе G₁ через 24, 30 и 48 ч после добавления и снижение количества клеток в S-фазе, что свидетельствует о его влиянии на клеточный цикл. В клеточной линии PC 12 увеличение содержания клеток в G₁-фазе и снижение в S-фазе наблюдали только после обработки F2 в течение 30 ч (табл. 3). Аналогичные данные показаны и в других исследованиях. Так, например, фукоидан в концентрации 1.0 мг/мл увеличивал популяцию в фазах G₀/G₁ клеток карциномы печени (Huh7) и снижал популяцию в S-фазных клетках (Nagamine et al., 2009). Фукоидан подавлял размножение клеток и задерживал митотический цикл клеточных линий НСС (НАК-1А, КУН-2 и КУН-3), что выражалось ростом числа клеток в фазах G₂/M через 72 ч после добавления фукоидана (Fukahory et al., 2008). Фу-

коидан вызывает накопление клеток в G₁-фазе клеточного цикла Т-клеток лейкемии HTLV-1 (Haneji et al., 2005) и клеток бронхолегочной карциномы NSCLC-N6 (Riou et al., 1996). Из приведенных данных становится понятно, что фукоидан задерживает рост клеток в различных фазах в зависимости от вида опухоли.

Таким образом, мы показали, что фукоидан, выделенный из смеси коммерчески доступных бурых водорослей, индуцирует апоптотическую гибель клеток HeLa G-63 и PC 12; клетки ECV 304 тоже чувствительны к цитотоксическому действию этого сульфатированного полисахарида, но в существенно меньшей степени. Эффективность действия фукоидана на клетки, результатом которого являются индукция апоптоза и нарушение клеточного цикла, зависит от многих факторов: дозы, времени обработки, типа опухолевых клеток, а также характеристик самого фукоидана — его источника, способа получения и состава выделенной фракции (содержания сульфогрупп и сахаров).

Мы благодарим Л. В. Коневегу за техническое содействие в проведении экспериментов.

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания № 17.1360.2014/К (раздел работы, соответствующей табл. 1).

Список литературы

- Bilan M. I., Zakharova A. N., Grachev A. A., Shashkov A. S., Nifant'ev N. E., Usov A. I. 2007. Полисахариды водорослей. 60. Фукоидан из тихоокеанской бурой водоросли *Analipus japonicus* (Harv.) Winne (Ectocarpalesi Scytosiphonaceae). Биоорг. химия. 33 (1) : 44—53. (Bilan M. I., Zakharova A. N., Grachev A. A., Shashkov A. S., Nifant'ev N. E., Usov A. I. 2007. Polysaccharides from seaweeds. 60. Fucoidan from Pacific brown alga *Analipus japonicus* (Harv.) Winne (Ectocarpalesi Scytosiphonaceae). Russ. J. Bioorg. Chem. 33 (1) : 44—53.)
- Гильяно Н. Я., [Семенова Е. Г.], Федорцева Р. Ф., Коневега Л. В. 2008. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV 304. II. Функциональные особенности клеток. Цитология. 50 (7) : 576—584. (Giliano N. Ya., [Semenova E. G.], Fedortseva R. F., Konevga L. V. 2008. Characteristics of the spontaneously transformed human endothelial cell line ECV 304. II. Functional responses of the ECV 304 cells. Tsitologiya. 50 (7) : 576—584.)
- Ярцева Н. М., Федорцева Р. Ф. 2008. Характеристика спонтанно трансформированной эндотелиальной клеточной линии человека ECV 304. Цитология. 50 (7) : 568—575. (Yartseva N. M., Fedortseva R. F. 2008. Characteristics of the spontaneously transformed human endothelial cell line ECV 304. Tsitologiya. 50 (7) : 568—575.)
- Aisa Y., Miyakawa Y., Nakazato T., Shibata H., Saito K., Ikeda Y., Kizaki M. 2005. Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. Amer. J. Hematol. 78 : 7—14.
- Ale M. T., Maruyama H., Tamauchi H., Mikkelsen J. D., Meyer A. S. 2011a. Fucoidan from *Sargassum* sp. and *Fucus vesiculosus* reduces cell viability of lung carcinoma and melanoma cells *in vitro* and activates natural killer cells in mice *in vivo*. Int. J. Biol. Macromol. 49 : 331—336.
- Ale M. T., Maruyama H., Tamauchi H., Mikkelsen J. D., Meyer A. S. 2011b. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. Mar. Drugs. 9 : 2106—2130.
- Bilan M. I., Grachev A. A., Shashkov A. S., Kelly M., Sander-son C. J., Nifant'ev N. E., Usov A. I. 2010. Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*. Carbohydr. Res. 345 : 2038—2047.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Chandia N. P., Matsushiro B. 2008. Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Paeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. Int. J. Biol. Macromol. 42 : 235—240.
- Costa L. S., Telles C. B., Oliveira R. M., Nobre L. T., Dantas-Santos N., Camara R. B., Costa M. S., Almeida-Lima J., Melo-Silveira R. F., Albuquerque I. R., Leite E. L., Rocha H. A. 2011. Heterofucan from *Sargassum filipendula* induces apoptosis in HeLa cells. Mar. Drugs. 9 : 603—614.
- Cumashi A., Ushakova N. A., Preobrazhenskaya M. E., D'Incecco A., Piccoli A., Totani L., Tinari N., Morozevich G. E., Berman A. E., Bilan M. I., Usov A. I., Ustuzhanina N. E., Sander-son C. J., Kelly M., Rabinovich G. A., Iacobelli S., Nifant'ev N. E. 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. Glycobiology. 17 : 541—552.
- Dean P. N., Cray J. W., Dolbeare F. A. 1982. The analysis and interpretation of DNA distributions measured by flow cytometry. Cytometry. 3 : 188—195.
- Dodgson K. S. 1961. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymatic and non-enzymatic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. Biochem. J. 78 : 312—319.
- Dodgson K. S., Price R. G. 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. Biochem. J. 84 : 106—110.
- Fried J., Perez A. G., Clarkson B. D. 1978. Rapid hypotonic method for flow cytofluorometry of monolayer cell cultures. Some pitfalls in staining and data analysis. J. Histochem. Cytochem. 26 : 921—933.
- Fukahory S., Yano H., Akiba J., Ogasavara S., Momosaki S., Sanada S., Kuratomi K. 2008. Fucoidan, a major component of brown seaweed, prohibits the growth of human cancer cell lines *in vitro*. Mol. Med. Rep. 1 : 537—542.
- Haneji K., Matsuda T., Tomita M., Kawacami H., Ohshiro K., Uchihara J. N., Masuda M., Takasu N., Tanaka Y., Ohta T., Mori N. 2005. Fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus* Tokida induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type 1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. Nutrition and Cancer. 52 : 189—201.
- Holtkamp A. D., Kelly S., Ulber R., Lang S. 2009. Fucoidans and fucoidanases — focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82 : 1—11.
- Hughes S. E. 1996. Functional characterization of spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV-304: use *in vitro* model of angiogenesis. Exp. Cell Res. 225 : 171—185.
- Kim J. E., Morya V. K., Lee H. B., Nguyen H. D., Park S. J., Kim E. K. 2011. Depigmenting effect of different molecular weight fucoidan from *Fucus vesiculosus*. In: The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Spring Meeting. Jeju. 272.
- Kim M. H., Joo H. G. 2008. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cell. Immunol. Lett. 115 : 138—143.
- Li B., Lu F., Wey X., Zhao R. 2008. Fucoidan: structure and bioactivity. Molecules. 13 : 1671—1695.
- Mandal P., Mateu C. G., Chattopadhyay K., Pujol C. A., Damonte E. B., Ray B. 2007. Structural features and antiviral activity of sulfated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. Antivir. Chem. Chemother. 18 : 153—162.
- Marudhupandi, T., Kumar T. T. A. 2013. Antibacterial effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against the chosen human bacterial pathogens. Int. Current Pharm. J. 2 : 156—158.
- Maruyama H., Tamauchi H., Hashimoto M., Nakano T. 2005. Suppression of Th2 immune responses by mekabu fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls. Int. Arch. Allergy Immunol. 137 : 289—294.

- Morua V. K., Kim J., Kim E.-K. 2012. Algal fucoidan: structural and size-dependent bioactivities and their perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93 : 71—82.
- Muravnik L. E., Shavarda A. L. 2012. Leaf glandular trichomes in *Empetrum nigrum*: morphology, histochemistry, ultrastructure and secondary metabolites. Nordic J. Bot. 30 : 470—481.
- Nagamine T., Hayakawa K., Kusacabe T., Takada H., Nakazato K., Iha M. 2009. Inhibitory effect of fucoidan on Huh7 hepatoma cells through downregulation of CXCL12. Nutrition and Cancer. 61 : 340—347.
- Nishino T., Nagumo T., Kiyohara H. 1991. Structure characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. Carbohydr. Res. 211 : 77—90.
- Riou D., Collic-Jouault S., Pinczon C. D., Bosch S., Siavoshian S., Bert V. L. 1996. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. Anticancer Res. 16 : 1213—1218.
- Senthilkumar K., Manivasagan P., Venkatesan J., Kim S. K. 2013. Brown seaweed fucoidan: biological activity and apoptosis, growth signaling mechanism in cancer. Int. J. Biol. Macromol. 60 : 366—374.
- Shwetank Date O. S., Kim K. S., Manjunath R. 2013. Infection of human endothelial cells by Japanese encephalitis virus: increased expression and release of soluble HLA-E. PLoS ONE. 8 : e79197.
- Stepanov S. I., Konyshev V. N., Kotlovanova L. V., Roganov A. P. 1996. Karyotyping of individual cells with flow cytometry. Cytometry. 23 : 279—283.
- Trincherro J., Ponce N. M. A., Cordoba O. L., Flores M. L., Pampuro S., Stortz C. A., Salomon H., Turk G. 2009. Antiretroviral activity of fucoidans extracted from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*. Phytother. Res. 23 : 707—712.
- Vishchuk O. S., Tarbeeva D. V., Ermakova S. P., Zvyagintseva T. N. 2012. Structural characteristics and biological activity of Fucoidans from the brown algae *Alaria* sp. and *Saccharina japonica* of different reproductive status. Chem. Biodivers. 9 : 817—828.
- Wang W. T., Zhou J. H., Xing S. T., Guan H. S. 1994. Immunomodulating action of marine algae sulfated polysaccharides on normal and immunosuppressed mice. Chin. J. Pharm. Toxicol. 8 : 199—202.
- Yamasaki-Miyamoto Y., Yamasaki M., Tachibana H., Yamada K. 2009. Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells. J. Agric. Food Chem. 57 : 8677—8682.
- Zhang Z., Teruya K., Eto H., Shirahata S. 2013. Induction of apoptosis by low-molecular-weight fucoidan through calcium- and caspase-dependent mitochondrial pathways in MDA-MB-231 breast cancer cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. 77 : 235—242.

Поступила 18 VI 2015

EFFECT OF FUCOIDANS ISOLATED FROM SEaweEDS *LAMINARIA DIGITATA* AND *FUCUS VESICULOSUS* ON CELL LINES HELA G-63, ECV 304 AND PC 12

E. V. Zhurishkina,¹ I. M. Lapina,¹ D. R. Ivanen,¹ S. I. Stepanov,¹ S. V. Shvetsova,^{1, 2}
A. L. Shavarda,³ N. Ya. Giliano,¹ A. A. Kulminskaya^{1, 2}

¹ National Research Center «Kurchatov Institute», B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, 188300,

² St. Petersburg State Polytechnical University, 195251,

and ³ Research Resource Centre for Molecular and Cell Technologies, St. Petersburg State University, 199034;

^{1, 2} e-mail: kulm@omrb.pmpi.spb.ru

The aim of the research was to investigate cytotoxicity of fucoidans on mammals cells. Three different samples of fucoidans were isolated from mechanically grounded brown algae *Laminaria digitata* and *Fucus vesiculosus*. The sample F2 that differed from the others by higher sulfatation level and suppression of HeLa G-63 line culture growth was taken for further study in cell lines HeLa G-63, ECV 304 and PC 12. We have shown that fucoidan preparation F2 inhibits proliferation and induces cell death in a dose- and time-dependent manner for all investigated cell lines. Neuroendocrine tumor rat cell line PC 12 appeared to be the most sensitive to fucoidan treatment whereas endothelial human cells ECV 304 were the least sensitive.

Key words: fucoidan, proliferation, flow cytometry.