

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ФУКОИДАНА
ИЗ ВОДОРΟΣЛЕЙ *FUCUS VESICULOSUS* И ФРАКЦИЙ,
ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НЕГО С ПОМОЩЬЮ АНИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ,
НА КЛЕТКИ HeLa G-63, Hep G2 И Chang liver**

© **Е. В. Журишкина**,^{1,*} **С. И. Степанов**,¹ **С. В. Швецова**,^{1, 2}
А. А. Кульминская,^{1, 2} **И. М. Лапина**¹

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

*и ² Кафедра медицинской физики С.-Петербургского политехнического университета Петра Великого,
Санкт-Петербург, 195251;*

* *электронный адрес: furfur@yandex.ru*

В настоящей работе проведен сравнительный анализ влияния сульфатированных фукополисахаридов, выделенных из *Fucus vesiculosus*, на клетки HeLa G-63, Hep G2 и Chang liver. Исходный фукоидан (F3) и 2 фракции (F3-0.5 и F3-1), полученные из него с помощью анионообменной хроматографии, анализировали сочетанием химических методов и ИК-спектроскопии. Сравнение их действия на клетки показало, что F3 и F3-1, характеризующиеся повышенным содержанием сульфатов, преимущественным расположением сульфогрупп в положении С4 фукозного остатка и низким содержанием урановых кислот, ингибировали пролиферацию клеток наиболее активно. Самыми чувствительными к действию фукоиданов из *F. vesiculosus* оказались опухолевые клетки печени Hep G2, а наименее восприимчивыми — немалигнизированные клетки Chang liver.

Ключевые слова: фукоидан, сульфатированные полисахариды, клеточные линии

Фукоиданы, сульфатированные полисахариды, содержащиеся в бурых морских водорослях, часто называют «интригующим классом» биополимеров из-за проявления ими феноменально широкого спектра биологических активностей: антибактериальной (Marudhupandi, Kumar, 2013), антивирусной (Mandal et al., 2007; Trincheiro et al., 2009; Pavliga et al., 2016), антикоагулянтной (Durig et al., 1997; Jin et al., 2013; Zhao et al., 2016), противоопухолевой (Senthilkumar et al., 2013; Kwak, 2014; Zhang et al., 2016), иммуномодулирующей (Kima, Joo, 2008; Cho et al., 2014) и противовоспалительной (Li, Ye, 2015).

Огромное число публикаций, посвященных данной теме, условно можно разделить на три типа: работы, отмечающие проявление той или иной биологической активности фукоиданов (Mandal et al., 2007; Kwak, 2014), подробные исследования строения полисахаридов (тип связи моносахаридов в основной цепи, структура разветвлений, углеводный состав, степень сульфатирования и т. д.) (Билан и др., 2007; Bilan et al., 2010) и попытки выяснения взаимосвязи структуры и свойств фукоиданов (Nishino et al., 1994; Croci et al., 2011; Anastuyuk et al., 2012).

Фукоиданы, выделяемые из бурых водорослей, представляют собой смесь сульфатированных фукополисахаридов, различающихся соотношением моносахаридных остатков, декорирующих основную цепь, молекулярной массой и степенью сульфатирования. Для получения их структурных характеристик исследуемые образцы фрак-

ционируют различными способами в зависимости от целей эксперимента. Так, при исследовании фукоидана из водоросли *Fucus vesiculosus* 16 и 5 фракций полисахаридов, полученных сочетанием методов гель-фильтрации и анионообменной хроматографии, проверяли на наличие антикоагулянтной и фибринолитической активности (Nishino et al., 1994; Durig et al., 1997). В работе Рупереса и соавторов (Ruperez et al., 2002) авторы сравнивают антиоксидантные свойства фракций полисахаридов, полученных последовательной экстракцией водой, кислотой и щелочью, и нерастворимого осадка. Образцы фукоиданов, выделенные из водорослей *Saccharina japonica* (Jin et al., 2013) и *Agarum cribrosum* (Cho et al., 2014) и разделенные при помощи анионообменной хроматографии, а также гидролиза одной из фракций, проверяли на антикоагулянтную активность (Jin et al., 2013) и иммуномодулирующие свойства (Cho et al., 2014).

При изучении противоопухолевого действия сульфатированных фукополисахаридов чаще всего исследуют свойства либо грубого фукоидана, либо фракций, выделенных из него. Так, Анастук и соавторы (Anastuyuk et al., 2012) сравнивали цитотоксические свойства одной из фракций высокомолекулярного фукоидана из *F. vane-scens*, выделенной с помощью анионообменной хроматографии, и низкомолекулярного образца, полученного гидролизом этой же фракции. Меншова и соавторы (Menshova et al., 2015) сравнили цитотоксичность выделенных из бурой водоросли *Alaria angusta* ламинарана и

одной из трех фракций фукоидана, полученных с помощью анионообменной хроматографии. В ряде работ изучали цитотоксическое действие на клетки различных фракций полисахаридов, выделенных из *Ascophyllum nodosum*: альгината, фукоидана и аскофилана (Nakayasu et al., 2009; Jiang et al., 2010).

Чтобы понять, какие структурные элементы фукоидана определяют его активность, в частности цитотоксичность, необходимо провести сравнительный анализ грубого фукоидана и фракций, полученных из него различными способами. На сегодняшний день нам удалось найти единственную работу, где показаны результаты такого исследования, а именно влияния на рост опухолей и ангиогенез *in vivo* грубого фукоидана из *Laminaria saccharina* и двух фракций, выделенных из него (Crosi et al., 2011).

В предыдущей работе мы исследовали цитотоксичность грубой фракции сульфатированных фукополисахаридов, полученной из смеси водорослей *L. digitata* и *F. vesiculosus*, в отношении клеток HeLa G-63, PC-12 и ECV-304 (Журишкина и др., 2015). Задачами настоящей работы стали изучение и сравнение влияния грубого фукоидана, выделенного из *F. vesiculosus*, и фракций, полученных из него с помощью анионообменной хроматографии, на клетки карциномы человека HeLa G-63, опухолевые и немалигнизированные клетки печени (Hep G2 и Chang liver соответственно).

Материал и методика

Все реактивы приобретены в компаниях Sigma-Aldrich (Германия) и Acros Organics (США), если не указано иное.

Получение и анализ фракций фукоидана. В качестве источника фукоидана использовали механически измельченные бурые водоросли *F. vesiculosus* (ООО «Альганика», Санкт-Петербург). Грубую фракцию сульфатированных полисахаридов (F3) выделяли из сухих измельченных водорослей *F. vesiculosus* по методике (Bilan et al., 2010). Из 100 г сухих водорослей получали 3.8 г фукоидана F3. Далее водный раствор F3 (500 мг в 20 мл воды) наносили на колонку (3 × 20 см), содержащую анионообменную смолу DEAE-Sephacel в Cl⁻ форме, которую последовательно промывали водой и водными растворами NaCl 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 и 1.5 М, каждый раз до отрицательной реакции элюата на фенол-серноокислую пробу (Dubois et al., 1956). Солевые растворы диализовали и лиофилизовали. Для дальнейших экспериментов выбирали фракции, полученные при элюировании 0.5 М (F3-0.5) и 1.0 М (F3-1) растворами NaCl, выходы которых были максимальными и составили 137 и 152 мг соответственно. Количественный анализ моносахаридного состава фракций фукоиданов проводили методом ГЖХ ацетатов полиолов после кислотного гидролиза образцов раствором трифторуксусной кислоты по методике, описанной ранее (Билан и др., 2007), на хромато-масс-спектрометре GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Япония). Содержание сульфатов определяли турбодиметрическим методом (Dodgson, 1961; Dodgson, Price, 1962) после кислотного гидролиза образцов раствором HCl (1 М) при 100 °С в течение 6 ч, используя в качестве стандарта K₂SO₄. Присутствие уоновых кислот определяли модифицированным карбазольным методом (Bitter, Muir, 1962), используя галактуроновою кислоту в качестве стандарта. Содержание белка определяли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976),

используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин. ИК-анализ сульфатированных полисахаридов проводили на инфракрасном Фурье-спектрофотометре FTIR-8400S (Shimadzu, Япония).

Культивирование клеток. Клетки ткани нормальной печени человека (линия Chang liver) приобретены в Научно-исследовательского института вирусологии им. Д. И. Иванова (Москва). Клетки человеческой гепатобластомы (линия Hep G2) приобретены в Клеточном центре Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки карциномы человека (линия HeLa G-63) культивируются в лаборатории нашего института с 1963 г. Клетки культивировали во флаконах Карреля в среде Игла MEM (с L-глутамином) (ICN, США), содержащей 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота и 1 % смеси пенициллина и стрептомицина (Биолот, Санкт-Петербург), при 37 °С. Для построения кривых роста клетки выращивали в течение 24 ч, затем в культуральную среду добавляли фукоидан F3 и фракции F3-0.5, F3-1 в концентрации 120 мкг/мл. Через 24, 48 и 72 ч клетки, окрашенные бромистым этидием, считали на проточном цитометре, созданном в группе радиобиологии и медицины Петербургского института ядерной физики (Stepanov et al., 1996).

Цитотоксичность фукоидана оценивали с помощью МТТ-теста. Недифференцированные клетки всех линий рассевали в 96-луночные планшеты Cell+ (Sarstedt, Германия) (7000 клеток на лунку) и выращивали во влажной атмосфере с 5 % CO₂ при 37 °С. После 24 ч культивирования в питательную среду вносили сульфатированные полисахариды F3, F3-0.5 и F3-1 в концентрации 120 мкг/мл на 24, 48 и 64 ч. Для проведения МТТ-теста в среду к культивируемым клеткам добавляли 10 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) (Sigma, США) и выдерживали 4 ч при 37 °С. Для растворения кристаллов МТТ-формаза удаляли культуральную среду из лунок и добавляли 0.1 мл ДМСО. Помещали планшет на шейкер (200 об/мин) на 20 мин при 37 °С. Эксперимент повторяли 4 раза с положительными и отрицательными контролями. Оптическую плотность полученных растворов в лунках измеряли при длине волны поглощения 540 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Scientific, США). Результаты оценивали по оптической плотности содержимого экспериментальной и контрольной лунок. Долю погибших клеток (индекс цитотоксичности IC, %) рассчитывали по формуле $IC = [(K - O)/K] \cdot 100 \%$, где K — оптическая плотность контрольного, а O — экспериментального образцов.

Долю аннексин-положительных (апоптотических) клеток определяли при помощи набора FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis (Invitrogen, США). Клетки выращивали 24 ч, добавляли фукоидан в концентрации 120 мкг/мл и культивировали еще 48 ч. Проводили комбинированное окрашивание аннексином-FITC и иодидом пропидия в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Анализ образцов осуществляли на цитофлуориметре Cell Lab Quanta Sc (Beckman Coulter, США). Каждый эксперимент повторяли трижды. Количество аннексин-положительных клеток определяли как долю клеток, окрашенных аннексином V, но не окрашенных иодидом пропидия. В каждой пробе анализировали не менее 20 тыс. клеток.

Морфологические изменения в клетках, обработанных фукоиданом, определяли при микроскопическом исследовании культур, выращенных на покровных

Состав фракций фукоиданов F3, F3-0.5 и F3-1

Фракция фукоиданов	Нейтральные моносахариды, %					Уроновые кислоты, %	Сульфаты, %	Белок, %
	фукоза	глюкоза	ксилоза	галактоза	манноза			
F3	40.6	1.1	5.6	2.4	0.4	11.0	24.9	СК
F3-0.5	31.1	6.1	4.0	1.8	8.8	25.0	13.0	СК
F3-1	37.9	0.2	3.9	2.8	0.04	НО	25.1	СК

Примечание. НО — не определено, СК — следовые количества.

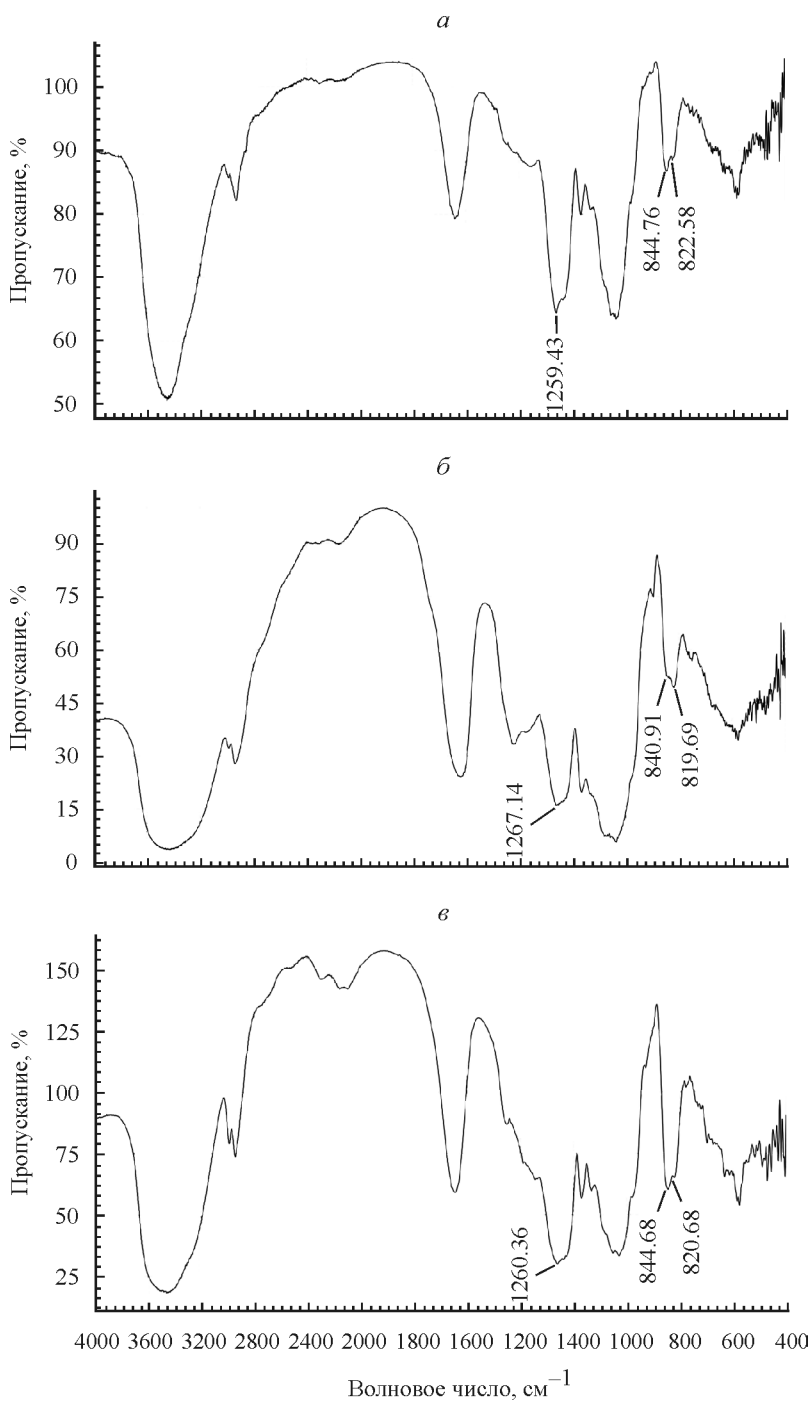


Рис. 1. ИК-спектры грубого фукоидана F3 (а), а также фракций F3-0.5 (б) и F3-1 (в), полученных из него с помощью анионообменной хроматографии.

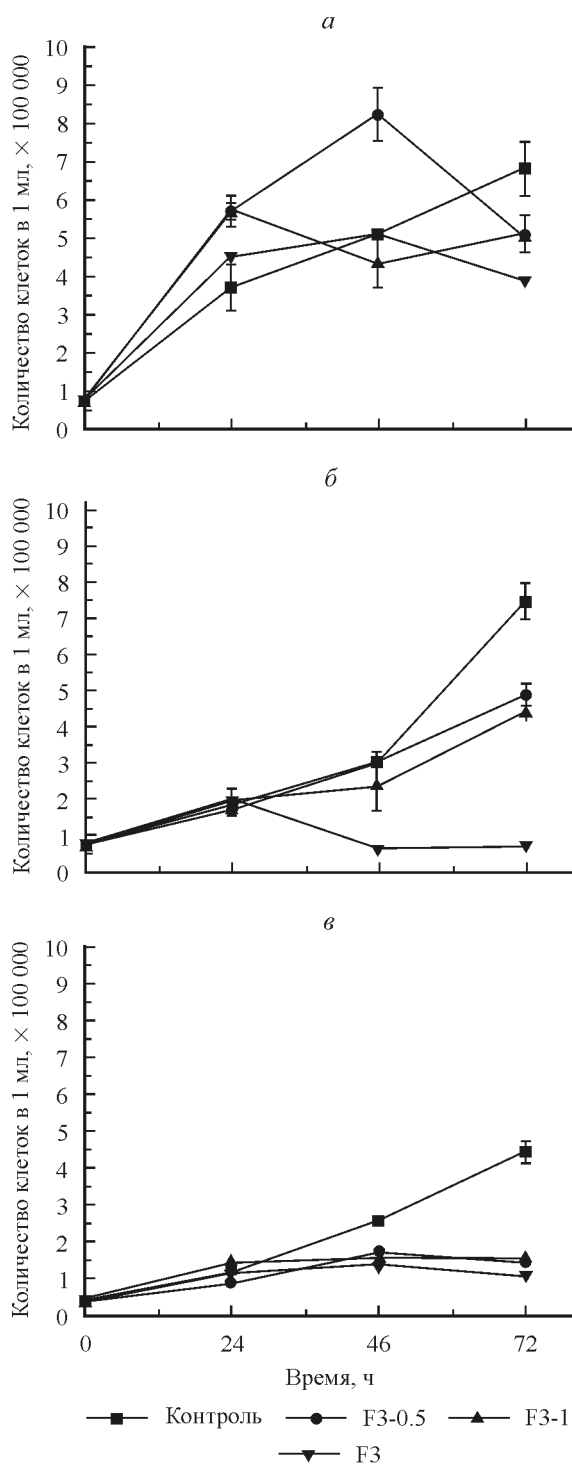


Рис. 2. Кривые скорости роста клеток HeLa G-63 (а), Hep G2 (б) и Chang liver (в) при культивировании в присутствии грубого фукоидана F3 и фракций F3-1 и F3-0.5 в концентрации 120 мкг/мл.

стеклах. Через 24 ч после посева клеток в питательную среду вносили фукоидан F3 в концентрации 120 мкг/мл. Через 48 ч фиксировали клетки 96%-ным этанолом, затем окрашивали ацетоорсеином и наблюдали с помощью светового микроскопа Leika DM 2500 (Leika Microsystems, Германия).

Для статистической обработки данных, построения графиков и диаграмм использовали Excel 2010 и Origin-

Pro 8. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. На графиках представлены средние значения не менее 3 независимых опытов.

Результаты

Исходный фукоидан F3 и полученные из него в результате анионообменной хроматографии фракции F3-0.5 и F3-1 представляют собой сульфатированные полисахариды с фукозой в качестве основного мономера. Состав этих фракций представлен в табл. 1.

Чтобы выявить положение сульфогрупп в сульфатированных полисахаридах, провели их ИК-анализ. В ИК-спектрах как исходного фукоидана F3, так и фракций F3-1 и F3-0.5 наблюдались интенсивные полосы поглощения, соответствующие связи S=O, при 1259, 1260 и 1267 см⁻¹ соответственно (рис. 1). Аксиальное положение (при C4) сульфатных групп фукоидана F3 определялось полосой поглощения при 844 см⁻¹, экваториальное (при C2) — при 822 см⁻¹ (Lloyd et al., 1961). Соотношение площадей S₈₄₄/S₈₂₂ составило 1.28, что указывает на преобладающее содержание сульфогрупп в аксиальном положении. ИК-спектр фракции F3-1 также показал, что сульфатные группы находятся преимущественно в аксиальном положении (соотношение S₈₄₄/S₈₂₀ = 1.29), тогда как из ИК-спектра фракции F3-0.5 следует, что сульфатные группы в основном находятся в экваториальном положении (соотношение S₈₂₀/S₈₄₁ = 1.4).

Анализ кривых скорости роста клеток HeLa G-63, Hep G2 и Chang liver показал, что грубый фукоидан F3 в отличие от фракций F3-0.5 и F3-1 ингибирует пролиферацию всех клеточных линий после 48 ч культивирования в его присутствии, причем клетки Hep G2 проявили наибольшую чувствительность к F3, тогда как для клеток Chang liver различия в реакции на все исследуемые препараты незначительны (рис. 2).

По данным проточной цитометрии, обработка клеток HeLa G-63, Chang liver и Hep G2 сульфатированными фукополисахаридами F3, F3-1 и F3-0.5 в концентрации 120 мкг/мл в течение 48 ч приводила к увеличению доли погибших клеток по сравнению с контролем (табл. 2). Действие фукоидана F3 на клетки во всех случаях выражено сильнее, чем фракций F3-0.5 и F3-1.

Таблица 2

Гибель клеток линий HeLa G-63, Chang liver и Hep G2 через 48 ч после внесения в питательную среду исходного фукоидана F3 и фракций F3-1 и F3-0.5 (120 мкг/мл)

Фукоидан	Доля погибших клеток, %		
	HeLa	Chang liver	Hep G2
—	13.3 ± 1.5	15.8 ± 1.9	24.8 ± 2
F3-0.5	23.6 ± 2.9 ^а	22.3 ± 2.5 ^б	38.1 ± 2.8 ^в
F3-1	35.9 ± 3.6 ^в	27.6 ± 1 ^а	33.7 ± 4.3 ^б
F3	48.2 ± 4.5 ^в	42.1 ± 3.6 ^в	72.5 ± 1.9 ^в

Примечание. Даны средние значения и их среднеквадратичные ошибки; достоверность различия с контролем при $p < 0.05$ (а), $p < 0.1$ (б) и $p < 0.01$ (в).

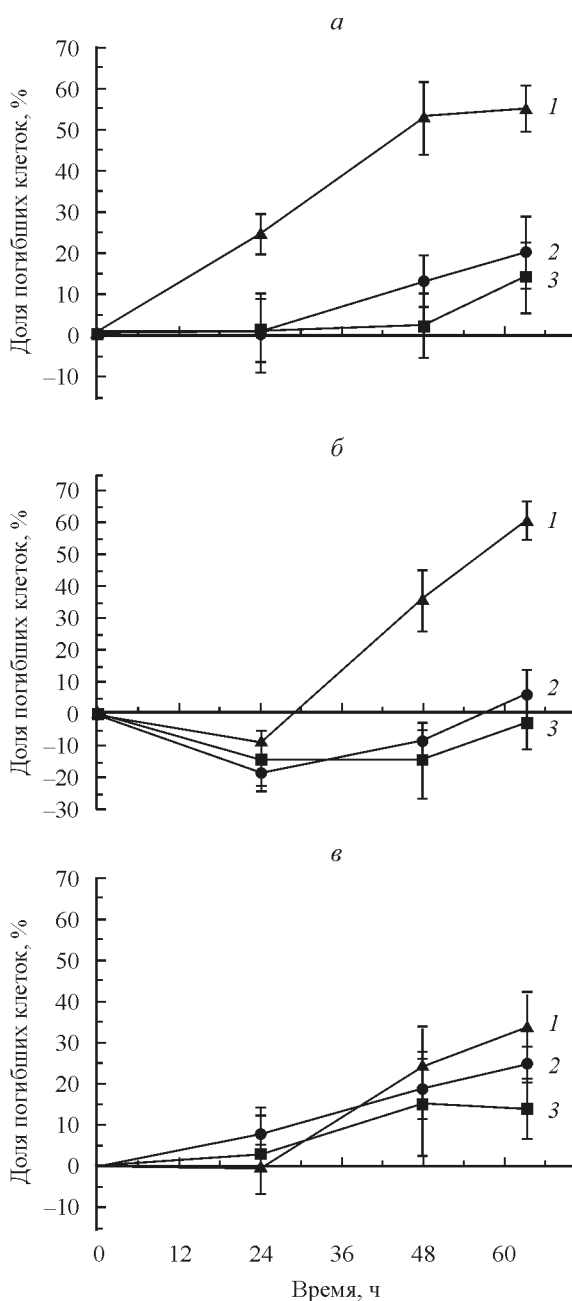


Рис. 3. Цитотоксичность грубого фукоидана F3 (1) и фракций F3-1 (2) и F3-0.5 (3) в отношении клеток линий HeLa G-63 (а), Hep G2 (б) и Chang liver (в). Результаты МТТ-теста.

Цитотоксичность фукоидана F3 и фракций F3-1 и F3-0.5 оценивали с помощью МТТ-теста после присутствия их в среде в течение 24, 48 и 64 ч. Грубый фукоидан F3 угнетает выживаемость всех клеточных линий после 48 ч воздействия, причем наиболее чувствительными к нему оказались клетки HeLa G-63 и Hep G2. Фракция F3-1 оказала умеренное ингибирующее действие на клетки HeLa G-63 и Chang liver, но не на Hep G2. Фракция F3-0.5 проявила наименьшее ингибирующее влияние на HeLa G-63 и Chang liver, а в отношении клеток Hep G2 ингибирующего действия не наблюдали (рис. 3).

Для того чтобы выяснить, вызывают ли индукцию апоптоза в клетках фукоидан F3 и фракции F3-1 и F3-0.5, провели анализ с помощью двойного окрашивания аннек-

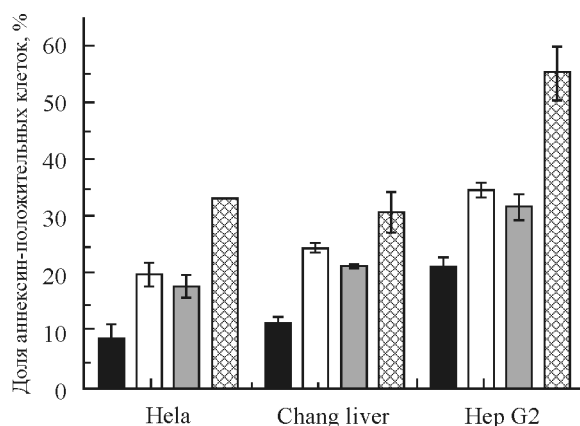


Рис. 4. Доля клеток, окрашиваемых аннексином V-FITC и не окрашиваемых иодистым пропидием (ранняя стадия апоптоза), от общего числа проанализированных клеток после обработки сульфатированными полисахаридами в дозе 120 мкг/мл в течение 48 ч.

Столбцы: черные — контроль, белые — фракция F3-0.5, серые — F3-1, заштрихованные — F3.

сином V-FITC и иодидом пропидия (PI). Из результатов, представленных на рис. 4, следует, что число апоптотических клеток (окрашенных аннексином V-FITC и не окрашенных PI) заметно увеличивается по сравнению с контролем через 48 ч культивирования с F3: в клетках Hep G2 — с 21 до 55 %, в клетках Chang liver — с 11 до 31, в клетках HeLa G-63 — с 8.6 до 33 %.

На рис. 5 показаны морфологические изменения клеток через 48 ч культивирования с фукоиданом F3 в концентрации 120 мкг/мл. К признакам апоптотической гибели можно отнести неровность контуров ядра и клеток, маргинацию и пикноз хроматина, фрагментацию ядра.

Обсуждение

Для того чтобы приблизиться к пониманию зависимости «структура сульфатированных фукополисахаридов — биологическая активность», мы осуществили сравнительный анализ влияния на клетки грубого фукоидана из *F. vesiculosus* и фракций, полученных из него с помощью анионообменной хроматографии. В качестве объекта настоящего исследования выбрали три клеточные линии — клетки карциномы человека HeLa G-63, обычно используемые в подобных исследованиях как «золотой стандарт» малигнизированной культуры, а также клетки печени Hep G2 и Chang liver, опухолевые и немалигнизированные соответственно. Выбор способа фракционирования грубого фукоидана обусловлен тем, что ионообменная хроматография позволяет разделить смеси сульфатированных полисахаридов с разным зарядом молекул.

Известно, что биологическая активность фукоиданов зависит от степени их сульфатирования (Cumashi et al., 2007; Ale et al., 2011a; Журишкина и др., 2015). Например, фракции фукополисахаридов из *F. vesiculosus*, содержащие большее количество сульфатов, проявляли более высокую антикоагулянтную активность (Nishino et al., 1994). Однако прямая корреляция между степенью сульфатирования и биологической активностью наблюдается не всегда. Так, Кроци и соавторы (Crocì et al., 2011) показали, что наибольшее ингибирующее влияние

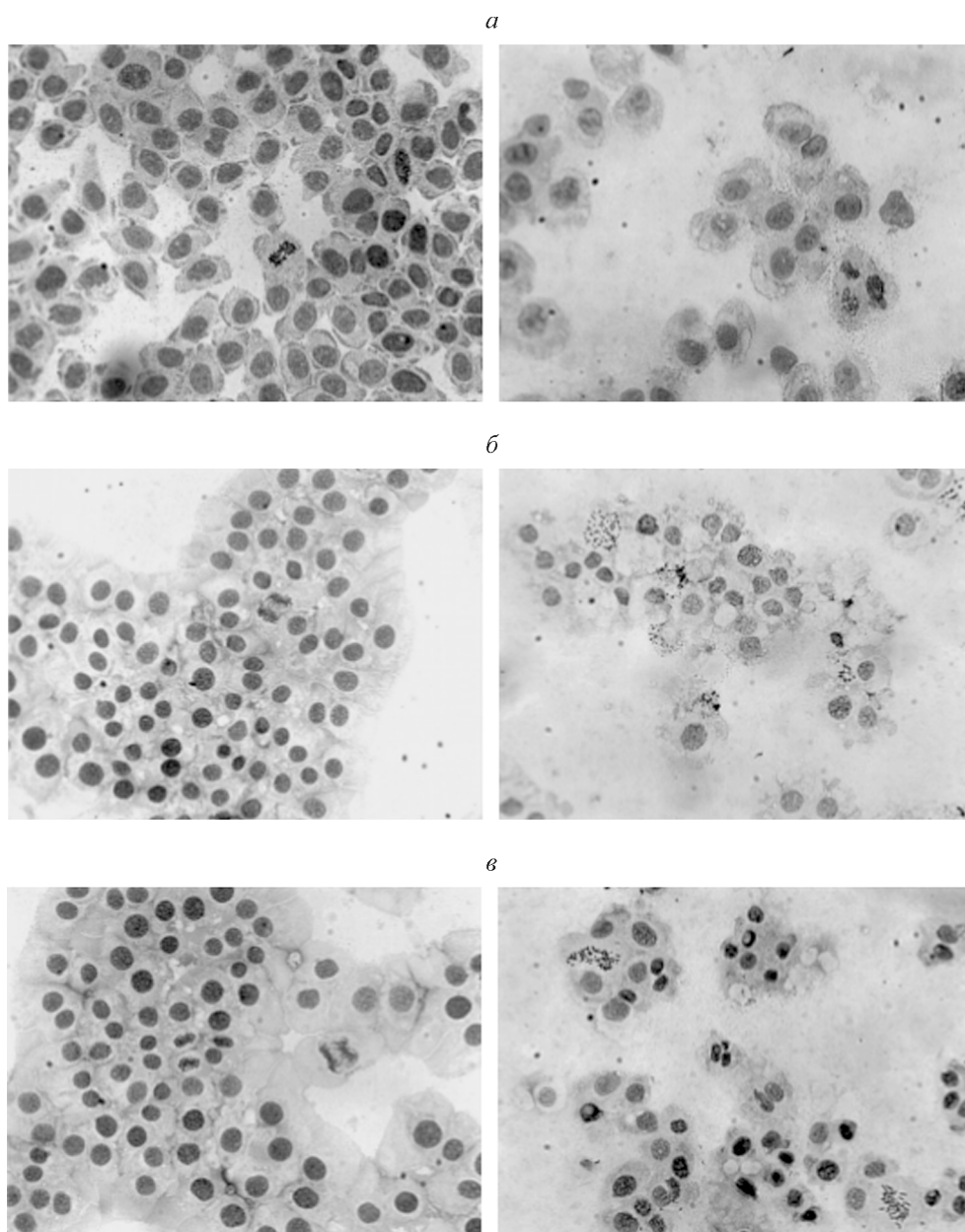


Рис. 5. Морфологические изменения клеток HeLa G-63 (а), Hep G2 (б) и Chang liver (в) после 48 ч культивирования с грубым фукоиданом F3 в концентрации 120 мкг/мл.

Левая колонка — контроль, правая — F3. Об. 40×.

на рост опухолей и ангиогенез оказывает фракция фукополисахаридов из *L. saccharina* с повышенным содержанием сульфатов. Однако антикоагулянтное действие исходного фукоидана выше, чем у выделенной из него более сульфатированной фракции. В нашей работе наибольшее цитотоксическое влияние на клеточные линии проявили исходный фукоидан F3 и фракция F3-1 (рис. 2—4; табл. 2), содержание сульфатов в которых превосходило в 2 раза таковое во фракции F3-0.5. В свою очередь, несмотря на схожее количество сульфатов, исходный фукоидан F3 более цитотоксичен, чем F3-1. Это указывает на то, что степень сульфатирования не является единственным структурным параметром, определяющим биоактивность фукоиданов. Так, показана взаимосвязь между расположением сульфогрупп в молекуле фукоиданов и их ак-

тивностью (Pereira et al., 1999; Kasai et al., 2015). По данным ИК-анализа исследованных нами фракций полисахаридов, у проявивших большую цитотоксичность фукоиданов F3 и F3-1, сульфогруппы располагались преимущественно при положении C4 (рис. 1). Кроме того, высокое содержание уроновых кислот во фракции F3-0.5 (25 %) по сравнению с F3 и F3-1 в сочетании с более низким содержанием сульфатов и фукозы (табл. 1), а также преимущественное расположение SO_3^{2-} -групп при C2 делают фракцию F3-0.5 наименее цитотоксичной. Таким образом, вероятно, для проявления цитотоксического эффекта фукоиданом из *F. vesiculosus* существенными факторами являются достаточно высокая степень сульфатирования (25 %), преимущественное расположение SO_3^{2-} -групп при C4 фукозного остатка, низкое содержа-

ние уроновых кислот (менее 11 %) и повышенное количество фукозы.

Основным достоинством фукоиданов считается их нетоксичность для нормальных клеток (Yamasaki-Miyamoto et al., 2009; Vishchuk et al., 2012). В предыдущем исследовании (Журишкина и др., 2015) эндотелиальные клетки линии ECV 304 оказались чувствительными к действию фукоидана, полученного из смеси *F. vesiculosus* и *L. digitata*, но в значительно меньшей степени, чем опухолевые HeLa G-63 и PC 12. В настоящей работе немалигнизированные клетки Chang liver тоже заметно менее восприимчивы к воздействию образцов фукоидана из *F. vesiculosus*, чем другие клетки. Так, по данным МТТ-теста, через 64 ч после добавления исходного фукоидана F3 (120 мкг/мл) в среду доля погибших клеток HeLa G-63 и Hep G2 составляет 55.4 и 60.5 % соответственно, тогда как для линии Chang liver этот показатель составляет 33.6 % (рис. 3).

При помощи двойного окрашивания аннексином V-FITC и PI мы показали увеличение числа апоптотических клеток после обработки F3 для всех клеточных линий (рис. 4). Это согласуется с принятым сегодня основным объяснением противоопухолевого действия фукоиданов, связываемого с индукцией апоптоза (Yamasaki-Miyamoto et al., 2009; Ale et al., 2011в; Senthilkumar et al., 2013; Журишкина и др., 2015; Zhang et al., 2016). Замечено, что противоопухолевое действие сульфатированных полисахаридов зависит от типа раковых клеток. Например, пролиферация клеток меланомы подавлялась сильнее, чем клеток карциномы легкого под действием фукоиданов, выделенных из *Sargassum* sp. и *F. vesiculosus* (Ale et al., 2011в). Мы показали, что опухолевые клетки печени Hep G2 проявили большую чувствительность к действию фукоидана F3, чем клетки карциномы HeLa G-63 (рис. 2—3; табл. 2). Ранее мы показали, что восприимчивость клеток PC 12 к фукоидану, полученному из смеси *F. vesiculosus* и *L. digitata*, выше, чем у клеток HeLa G-63 (Журишкина и др., 2015).

Таким образом, анализ образцов фукополисахаридов продемонстрировал, что фракции, полученные из исходного фукоидана с помощью анионообменной хроматографии, различаются по степени сульфатирования, содержанию уроновых кислот, а также содержанию фукозы и положению сульфатных групп в фукозном остатке. Выявлено, что на цитотоксичность фукоидана оказывает влияние сочетание вышеперечисленных факторов. Среди сравниваемых клеточных линий наибольшую чувствительность к фукоидану из *F. vesiculosus* проявляют опухолевые клетки печени Hep G2.

Авторы выражают глубокую благодарность Н. Я. Гильяно за техническое содействие в проведении экспериментов и обсуждение результатов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00109).

Список литературы

- Билан М. И., Захарова А. Н., Грачев А. А., Шашков А. С., Нифантьев Н. Э., Усов А. И. 2007. Полисахариды водорослей. 60. Фукоидан из тихоокеанской бурой водоросли *Analipus japonicus* (Harv.) Winne (Ecto carpalesi Scytosiphonaceae). Биоорг. химия. 33 (1): 44—53. (Bilan M. I., Zakharova A. N., Grachev A. A., Shashkov A. S., Nifantiev N. E., Usov A. I. 2007. Polysaccharides from sea weeds. 60. Fucoidan from Pacific brown alga *Analipus japonicus* (Harv.) Winne (Ecto carpalesi Scytosiphonaceae). Russ. J. Bioorg. Chem. 33 (1): 44—53.)
- Журишкина Е. В., Лапина И. М., Иванен Д. Р., Степанов С. И., Швецова С. В., Шаварда А. Л., Гильяно Н. Я., Кульминская А. А. 2015. Влияние фукоиданов, выделенных из водорослей *Laminaria digitata* и *Fucus vesiculosus*, на клетки HeLa G-63, ECV 304 и PC 12. Цитология. 57 (10): 727—735. (Zhurishkina E. V., Lapina I. M., Ivanen D. R., Stepanov S. I., Shvetsova S. V., Shavarda A. L., Giliano N. Ya., Kulminskaya A. A. 2015. Effect of fucoidans isolated from seaweeds *Laminaria digitata* and *Fucus vesiculosus* on cell lines HeLa G-63, ECV 304 and PC 12. Tsitologiya. 57 (10): 727—735.)
- Ale M. T., Maruyama H., Tamauchi H., Mikkelsen J. D., Meyer A. S. 2011в. 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.
- Ale M. T., Maruyama H., Tamauchi H., Mikkelsen J. D., Meyer A. S. 2011в. 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.
- Anastyuk S. D., Shevchenko N. M., Ermakova S. P., Vishchuk O. S., Nazarenko E. L., Dmitrenok P. S., Zvyagintseva T. N. 2012. Anticancer activity *in vitro* of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem mass-spectrometry. Carbohydr. Polymers. 87: 186—194.
- Bilan M. I., Grachev A. A., Shashkov A. S., Kelly M., Sanderson C. J., Nifantiev 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.
- Bitter T., Muir H. M. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Biochem. 4: 330—334.
- 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.
- Cho M. L., Lee D.-J., Kim J.-K., You S. 2014. Molecular characterization and immunomodulatory activity of sulfated fucans from *Agarum cribrosum*. Carbohydr. Polymers. 113: 507—514.
- Croci D. O., Cumashi A., Ushakova N. A., Preobrazhenskaya M. E., Piccoli A., Totani L., Ustyuzhanina N. E., Bilan M. I., Usov A. I., Grachev A. A., Morozovich G. E., Beran A. E., Sanderson C. J., Kelly M., Gregorio P. D., Rossi C., Tinari N., Iacobelli S., Rabinovich G. A., Nifantiev N. E. 2011. Fucans, not fucomannoglucuronans, determine the biological activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria saccharina* brown seaweed. PLoS ONE. 6: e17283.
- Cumashi A., Ushakova N. A., Preobrazhenskaya M. E., D'Incecco A., Piccoli A., Totani L., Tinari N., Morozovich G. E., Beran A. E., Bilan M. I., Usov A. I., Ustyuzhanina N. E., Sanderson C. J., Kelly M., Rabinovich G. A., Iacobelli S., Nifantiev 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.
- 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.
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar sandrelated substances. Anal. Chem. 28: 350—356.
- Durig J., Bruhn T., Zurborn K.-H., Gutensohn K., Bruhn H. D., Beress L. 1997. Anticoagulant fucoidan fraction from *Fucus vesiculosus* induce platelet activation *in vitro*. Thromb. Res. 85: 479—491.

- Jiang Z., Okimura T., Yokose T., Yamasaki Y., Yamaguchi K., Oda T. 2010. Effect of sulfated fucan, ascophyllan, from the brown alga *Ascophyllum nodosum* on various cell lines: a comparative study on ascophyllan and fucoidan. *J. Biosci. Bioeng.* 110 : 113—117.
- Jin W., Zhang Q., Wang J., Zhang W. 2013. A comparative study of the anticoagulant activities of eleven fucoidans. *Carbohydr. Polymers.* 91 : 1—6.
- Kasai A., Arafuka Sh., Koshiba N., Takahashi D., Toshima K. 2015. Systematic synthesis of low-molecular weight fucoidan derivatives and their effect on cancer cells. *Org. Biomol. Chem.* 13 : 10 556—10 568.
- Kima M. H., Joo H. G. 2008. Immunostimulatory effects of fucoidan on bone marrow-derived dendritic cell. *Immunol. Lett.* 115 : 138—143.
- Kwak J.-Y. 2014. Fucoidan as a marine anticancer agent in pre-clinical development. *Mar. Drugs.* 12 : 851—870.
- Li X. J., Ye Q. F. 2015. Fucoidan reduces inflammatory response in a rat model of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 93 : 999—1005.
- Lloyd A. G., Dodgson K. S., Price R. G., Rose F. A. 1961. Infrared spectra of sulphate esters. I. Polysaccharide sulphates. *Biochim. Biophys. Acta.* 46 : 108—115.
- 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.
- Menshova R. V., Anastyuk S. D., Ermakova S. P., Shevchenko N. M., Isakov V. I., Zvyagintseva T. N. 2015. Structure and anticancer activity *in vitro* of sulfated galactofucan from brown alga *Alaria angusta*. *Carbohydr. Polymers.* 132 : 118—125.
- Nakayasu S., Soegima R., Yamaguchi K., Oda T. 2009. Biological activities of fucose-containing polysaccharide ascophyllan isolated from the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 : 961—964.
- Nishino T., Nishioka Ch., Ura H., Nagumo T. 1994. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydr. Res.* 255 : 213—224.
- Pavliga S. N., Kompanets G. G., Tsygankov V. Y. 2016. The experimental research (*in vitro*) of carrageenans and fucoidans to decrease activity of Hantavirus. *Food Environ. Virol.* 8 : 120—124.
- Pereira M. S., Mulloy B., Mourao P. A. 1999. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J. Biol. Chem.* 274 : 7656—7667.
- Ruperez P., Ahrazem O., Leal J. A. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* 50 : 840—845.
- 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
- Stepanov S. I., Konyshev V. N., Kotlovanova L. V., Roganov A. P. 1996. Karyotyping of individual cells with flow cytometry. *Cytometry.* 23 : 279—283.
- Trinhero 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.
- 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 J., Riby J. E., Conde L., Grizzle W. E., Cui X., Skibola C. F. 2016. A *Fucus vesiculosus* extract inhibits estrogen receptor activation and induces cell death in female cancer cell lines. *BMC Complement. Altern. Med.* 16 : 151—159.
- Zhao X., Guo F., Hu J., Zhang L., Xue Ch., Zhang Zh., Li B. 2016. Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*. *Thromb Res.* 144 : 46—52.

Поступила 20 VIII 2016

COMPARATIVE EFFECT OF FUCOIDAN FROM ALGA *FUCUS VESICULOSUS*
AND ITS FRACTIONS, OBTAINED BY ANION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY,
ON CELL LINES HeLa G-63, Hep G2 AND CHANG LIVER

E. V. Zhurishkina,^{1,*} S. I. Stepanov,¹ S. V. Shvetsova,^{1,2} A. A. Kulminskaya,^{1,2} I. M. Lapina¹

¹ National Research Center «Kurchatov Institute»,

B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, Leningrad Region, 188300, and

² Department of Medical Physics, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251;

* e-mail: furfur@yandex.ru

The aim of the present study was to compare the effect of sulfated fucopolysaccharides isolated from *Fucus vesiculosus* on cell lines HeLa G-63, Hep G2 and Chang liver. Native fucoidan F3 and two fractions (F3-0.5 and F3-1), obtained by anion-exchange chromatography, were analyzed using chemical methods and IR-spectroscopy. Their action on cells demonstrates that F3 and F3-1, characterized by higher content of sulfates, preferable location of sulfo-groups at C4 atom of fucose residue and low content of uronic acids, inhibit cell proliferation more efficiently. Human liver tumor cells Hep G2 appeared to be the most sensitive to fucoidan treatment whereas nonmalignant human cells Chang liver were the least sensitive.

Key words: fucoidan, sulfated polysaccharides, cell lines