УДК 577.12

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ И ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФУКОИДАНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БУРЫХ ВОДОРОСЛЕЙ *FUCUS VESICULOSUS*

Введение

Морские водоросли являются ценным источником различных органических и минеральных веществ. Полисахариды, выделяемые из них, широко применяют в пищевой и медицинской промышленности. Особый интерес представляют бурые водоросли, клеточные стенки которых содержат сульфатированные полисахариды, называемые фукоиданами, т.к. основным мономером этих полисахаридов является фукоза. Уникальность этих биополимеров обусловлена наличием широкого спектра биологических активностей: антивирусной, антибактериальной, антикоагулянтной, иммуностимулирующей, противовоспалительной и противоопухолевой [1, 2], что в последние десятилетия делает их объектом пристального внимания исследователей во всем мире.

Ранее в лаборатории энзимологии ПИЯФ было исследовано цитотоксическое действие фукоидана, выделенного из коммерчески доступных водорослей, приобретенных в ООО «Альганика», клеточные линии карциномы шейки матки (HeLa G-63), эндотелиоциты человека (ECV 304), нейроэндокринной опухоли крысы (PC 12), опухолевых (Hep G2) и немалигнизированных (Chang liver) клеток печени человека. Было показано, что опухолевые клетки проявляют к фукоидану заметно большую чувствительность, чем немалигнизированные [3, 4].

Целью данной работы являлось сравнение антибактериальных и цитотоксических свойств грубой и очищенной фракций фукоидана из водорослей *Fucus vesiculosus,* собранных в литорали Баренцева моря.

Материалы и методы исследования:

Все реактивы были приобретены в компаниях Sigma-Aldrich и Acros Organics (США), если иное не указано, среда Игла — в фирме ICN (США), эмбриональная сыворотка и раствор Версена - в фирме Биолот (Санкт-Петербург).

В качестве сырья использовали талломы фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus* L.), собранные в губе Зеленецкой Баренцева моря. Водоросли замораживали и хранили при температуре -25°С. Талломы измельчали и последовательно обрабатывали органическим экстрагентом, этиловым спиртом, спирто-водными смесями в соответствии с запатентованной технологической схемой [5, 6]. Подготовленные водоросли экстрагировали методом перколяции с предварительной ультразвуковой обработкой. В качестве источника ультразвука использовали ультразвуковой аппарат “Волна” (Россия, ООО “Центр ультразвуковых технологий”). Экстракт концентрировали на ультрафильтрационной установке АР-3-100 ПС (Россия, НТП “Биотест), и сушили лиофильно, в результате получали фракцию фукоидана F. Очищенный образец сульфатированных полисахаридов Fo получали следующим образом: 1 г фукоидана F растворяли при перемешивании в 60 мл 2%-ного р-ра $CaCl_2$, и отделяли низкомолекулярную фракцию диализом в мешке с размером пор 3,5 kDa (Spektra/Por, Канада) против дистиллированной воды на 12 ч. Выпавшую в осадок нерастворимую часть отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 1 ч, надосадочный растворлиофилизовали.

Для проверки антибактериальной актиности были использованы условно патогенные грам-положительные штаммы *Staphylococcus* sp. AR3916, *Bacillus* sp. 4A и грам-

отрицательные штаммы *Pasteurella* sp. и *Escherichia coli* BL2 из коллекции лаборатории.Культуры перечисленных бактерий поддерживали на среде LB при температуре 37ºC, для проведения экспериментов микроорганизмы сначала переносили в жидкую среду NB (nutritient broth). Антимикробная активность определяли методом серийных разведений в плотных средах [7]. Для этого готовили растворы исследуемых фракций фукоиданов F и Fo с расчетом, чтобы конечная концентрация составляла 16 мг/мл агаризованной среды. Тестируемую культуру микроорганизмов (при концентрации клеток 10^5 КОЕ/мл) переносили на поверхность среды и инкубировали 18–20 часов при температуре 37°C. Контролем служила чашка с агаром без препарата.

Клетки нейроэндокринной опухоли крысы PC 12 были получены из Российской коллекции клеточных культур Института Цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали во флаконах Карреля в среде МЕМ с L-глутамином, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 1 % гентамицина (Биолот, Санкт-Петербург) при 37°C.

Анализ моносахаридного состава фукоидана выполнен с использвоанием ВЭЖХ [8]. Для этого каждую фракцию фукоидана гидролизовали с помощью 2М трифторуксусной кислоты в течение 6 ч. Гидролизованные полисахариды охлаждали в бане с ледяной водой и центрифугировали при 2300 g (3500 об / мин) в течение 15 минут при 25°C на медицинской лабораторной центрифуге (Elmi CM-6M, Elmi Ltd, Рига, Латвия). Фракцию супернатанта нейтрализовали до pH 7 с помощью 2 М раствора NaOH. Полученные образцы анализировали с использованием ВЭЖХ на хроматографе LC-10A с детектором RID-10A (Shimadzu Corp.).

Количественное содержание белка определяли методом Брэдфорд [9]. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (БСА).

Содержание сульфатных остатков в изучаемых полисахаридах определяли с помощью турбидиметрического метода [10] после кислотного гидролиза образцов одномолярным раствором HCl при 100°C в течение 6 ч. В качестве стандарта использовали K_2SO_4.

Для оценки цитотоксичности недифференцированные клетки нейроэндокринной опухоли крысы PC 12 рассевали в 96-луночные планшеты (Cell+, Sarstedt, Германия) (8000 клеток на лунку) и выращивали во влажной атмосфере при 37°C и 5 % CO_2. Через 24 ч в питательную среду вносили фукоиданы F и Fo в концентрациях от 100 до 700 мкг/мл и продолжали культивировать клетки при тех же условиях в течение 48 часов. Затем среду из лунок отбирали, вносили среду с ресазурином в концентрации 0.5 мг/мл и после выдержки в течение 4 ч анализировали на мультипланшетном спектрофотометре Multiscan FL (Thermo Scientific, США) [11]. Результаты оценивали, исходя из оптической плотности содержимого экспериментальных и контрольных лунок при длине волны 540 нм. Индекс жизнеспособности был рассчитан по формуле: (Э/К)х100%, где К – контроль, Э– эксперимент. Для каждой концентрации фукоиданов эксперименты были выполнены в трех повторностях. Для обработки результатов использовали программное обеспечение OriginPro 9.0.

Результаты и обсуждение

Для оценки антибактериальной и цитотоксических активностей сульфатированных полисахаридов из водорослей *Fucus vesiculosus,* собранных в литорали Баренцова моря, был, прежде всего, охарактеризован химический состав полученных фракций. Результаты анализа состава образцов F и Fo. Следует отметить, что химический состав очищенной фракции фукоидана Fo, полученный в результате обработки фукоидана F раствором $CaCl_2$ существенно отличается от состава грубой фракции. Так, после обработки

грубой фракции F количество фукозы, маннозы, глюкозы и сульфатов снижается, количество ксилозы и галактозы увеличивается.

Полученные фракции фукоиданов тестировали в качестве антимикробных агентов для нескольких грам-положительных и грам-отрицательных бактериальных культур. Культура микроорганизмов считается чувствительной, если на месте посева нет роста ни одной колонии [7]. В нашем эксперименте бактерии *Escherichia coli* BL2 и *Bacillus* sp. 4A оказались чувствительными к воздействию неочищенной фракции фукоидана F. В то же время, очищенная фракция фукоидана Fo не проявляла детектируемой антибактериальной активности ни для одного из тестируемых штаммов.Для определения цитотоксичности были выбраны клетки опухоли крысы (линия PC 12) в качестве образца редкой группы опухолей, происходящих из нейроэндокринных клеток, способных продуцировать пептидные гормоны и биологически активные амины [34]. Цитотоксичность фукоиданов F и Fo по отношению к клеткам нейроэндокринной опухоли PC 12 оценивали при помощи теста с ресазурином. Метод определения основан на способности живых клеток восстанавливать голубой нефлуоресцирующий ресазурин до розового флуоресцентного ресоруфина. Ресазурин восстанавливается широким спектром ферментов: митохондриальными дегидрогеназами, а также цитохромами и дегидрогеназами, находящимися в цитоплазме клетки [12]. Было показано, что обработка клеток фукоиданами F и Fo угнетает выживаемость клеточной линии PC 12. Ингибирующий эффект F и Fo проявляется, начиная с концентраций 600 и 400 мкг/мл, соответственно.

.

Выводы:

Обработка фукоидана приводит к изменению химического состава сульфатированного полисахарида, и, как следствие, влияет на антибактериальную активность и на цитотоксичность. Из результатов исследования видно, что помимо различия в моносахаридном составе, фракции значительно отличаются по содержанию уроновых кислот, что коррелируется с содержанием альгинатов в фукоидане и непосредственно влияет на антибактериальную активностью.

Таким образом, неочищенная фракция F проявляют наибольшую антимикробную активность как против грамотрицательных бактерий E. Coli, так и грамположительных Bacilus sp 4a. Так же обе исследуемые фракции фукоидана - F и Fo являются цитотоксичными по отношению к клеткам нейроэндокринной опухоли PC 12. Однако, ингибирующий эффект очищенного фукоидана проявляется при более низкой концентрации, чем для неочищенной фракции.