

УДК 579

ВЛИЯНИЕ ПОЛИДИСПЕРСНЫХ ФУКОИДАНОВ ИЗ *FUCUS VESICULOSUS* НА КЛЕТКИ HEP G2 И CHANG LIVER**И.М. Лапина***Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт, Гатчина, Россия*

Фукоиданы, сульфатированные полисахариды, содержащиеся в клеточных стенках бурых морских водорослей, часто называют «интригующим классом» биополимеров из-за проявления ими феноменально широкого спектра биологических активностей: антибактериальной, антивирусной, антикоагулянтной, противовоспалительной, иммуномодулирующей и противоопухолевой. Перспектива применения фукоиданов в противоопухолевой терапии обусловлена их селективной цитотоксичностью по отношению к раковым клеткам по сравнению со здоровыми клетками.

Ранее нами была исследована биологическая активность сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей *Laminaria digitata* и *Fucus vesiculosus* в отношении трех клеточных линий: клеток карциномы человека HeLa G-63, линии эндотелиоцитов человека ECV 304 и клеток нейроэндокринной опухоли крысы PC 12 [1]. Было показано, что опухолевые клетки проявляют к фукоидану заметно большую чувствительность, чем немалигнизированные.

Далее, в дополнение к клеткам HeLa G-63, в качестве объектов исследования были взяты клетки печени человека Hep G2 и Chang liver, был проведен сравнительный анализ влияния грубого фукоидана из *Fucus vesiculosus* и фракций, полученных при помощи анионообменной хроматографии. Было показано, что эффективность воздействия фукоидана на клетки, результатом которого является индукция апоптоза и нарушение клеточного цикла, зависит от многих факторов: дозы, времени обработки клеток фукополисахаридами, типа клеток, а также характеристик самого фукоидана: его источника, способа получения и состава [2].

Неоднородность состава и большой размер молекул фукоидана мешают выяснению зависимости «структура фукополисахаридов – биологическая активность», вследствие чего и тормозится их применение в медицине. Целью нашей следующей работы стало исследование воздействия двух образцов полидисперсных фукоиданов с различными соотношениями высокомолекулярных и низкомолекулярных фракций в составе на клетки печени Hep G2 и Chang liver.

Был выбран метод экстракции полисахаридов из водорослей *F. vesiculosus* без использования кислот, при котором полисахариды сохраняют свою исходную молекулярную массу. В нативном фукоидане, по данным ВЭЖХ, содержание высокомолекулярных и низкомолекулярных фракций было примерно поровну. При помощи мягкого кислотного гидролиза в течение 5 минут и последующего диализа был получен частично деполимеризованный образец, в котором, по данным ВЭЖХ, содержание низкомолекулярных фракций уменьшилось примерно в 3 раза, тогда как данные, полученные методом гель-фильтрации, показывают, что частичный гидролиз состоялся. Средняя молекулярная масса нативного и частично деполимеризованного фукополисахаридов, определенная вискозиметрическим методом, составила 1730 кДа и 2502 кДа, соответственно. Сдвиг массового распределения в гидролизованном образце в более высокомолекулярную область по сравнению с нативным фукоиданом объясняется уменьшившимся вкладом низкомолекулярных фракций вследствие диализа. Также были сделаны ИК-спектры полисахаридов и определены моносахаридные составы их низко- и высокомолекулярных фракций.

Анализ кривых скорости роста клеток Hep G2 и Chang liver показал, что оба образца фукоиданов в дозе 180 мкг/мл ингибируют пролиферацию обеих клеточных линий после 48 ч культивирования. Клетки Hep G2 проявляют большую чувствительность к обоим фукоиданам по сравнению с клетками Chang liver.

По данным проточной цитометрии, обработка клеток Hep G2 и Chang liver сульфатированными фукополисахаридами в концентрации 180 мкг/мл в течение 24 и 48 ч приводила к увеличению доли погибших клеток по сравнению с контролем. Действие частично деполимеризованного фукоидана на клетки выражено сильнее, чем нативного, однако в большинстве случаев ниже статистически значимых различий. На клетки Hep G2 оба образца оказывают более сильное влияние после 48 ч обработки.

Для того, чтобы иметь возможность наблюдать непосредственное взаимодействие клеток и сульфатированных полисахаридов, исследуемые образцы были помечены флюоресцеинамином, степень замещения гидроксильных групп составила приблизительно 2 молекулы флюоресцеинамина на 100 мономеров фукозы. После добавления меченых фукоиданов в культуральную среду клеток Hep G2 и Chang liver, на конфокальном микроскопе велось наблюдение в течение 22 ч, изображение фиксировалось каждый час. Таким образом было выяснено, что фукоиданы интернализируются клетками обеих клеточных линий.

При этом количество везикулярных структур, содержащих флюоресцентно меченый фукоидан, существенно больше наблюдается у клеток Chang liver. При визуальном сравнении меченых сульфатированных полисахаридов внутри клеток в течение 22 ч видно, что не подвергавшийся кислотному гидролизу фукоидан в значительно большей степени поглощается клетками обоих типов, чем частично деполимеризованный, что можно, видимо, объяснить тем, что при одинаковой дозировке (180 мкг/мл) добавляемых в среду фукоиданов процентное соотношение низкомолекулярной фракции полисахаридов в составе нативного фукоидана больше, чем в составе частично деполимеризованного образца. Однако, тогда как оба образца фукоидана вызывают время-зависимую гибель клеток Hep G2, гибель клеток Chang liver через 22 часа практически не наблюдается.

Чтобы количественно оценить динамику накопления фукоиданов, клетки Hep G2 и Chang liver, обработанные мечеными фукоиданами в течение 4, 22 и 43 ч, были проанализированы на проточном цитометре. Детектировалась зеленая флюоресценция клеток, усвоивших меченые фукоиданы. Было показано время-зависимое возрастание флюоресценции для клеток обеих клеточных линий. Причём если через 22 ч преимущественно наблюдается поглощение нативного фукоидана клетками обеих линий, то через 43 ч накопление только в клетках Chang liver обоих образцов фукоиданов превышает таковое в клетках Hep G2.

Для выяснения, вызывают ли исследуемые образцы фукоиданов апоптотическую гибель клеток Hep G2 и Chang liver, было проведено двойное окрашивание красителями Yo-Pro и йодидом пропидия. Результаты показали, что число клеток в стадии раннего апоптоза при 24-часовом культивировании с обоими образцами фукоиданов превышает контрольные значения у Chang liver на 8.7 и 2.5 %, а у HepG2 на 6.9 и 4.7 %, соответственно. Через 48 ч культивирования с фукоиданами заметно возрастает число клеток в стадии позднего апоптоза (окрашенных как Yo-Pro, так и PI): у клеток Chang liver – более чем на 20 % по сравнению с контролем, у клеток Hep G2 – более чем на 50 %, тогда как процентное содержание клеток Chang liver в стадии раннего апоптоза практически не увеличивается, а клеток Hep G2 даже снижается. Как при 24-х, так и при 48-часовом культивировании не наблюдается заметных отличий в воздействии на клетки между нативным и частично деполимеризованным фукоиданами.

Для того чтобы выяснить, вызывает ли обработка сульфатированными фукополисахаридами увеличение числа везикул с кислым содержанием в клетках, было проведено их прижизненное окрашивание акридиновым оранжевым, который, являясь лизосомотропным агентом, свободно проникает через мембраны в незаряженном виде и аккумулируется в кислотных компартментах, где при кислых значениях pH образует агрегаты с красной флюоресценцией, интенсивность которой прямо пропорциональна степени кислотности или объема клеточных компартментов. Результаты показали, что оба образца фукоидана индуцируют рост числа везикул с кислым содержанием в клетках обеих линий.

По литературным данным, наличие везикул с кислотным содержанием, обнаруживаемыми окрашиванием акридиновым оранжевым, указывает на наличие аутофагии. Независимо от типа используемого фукоидана, количество везикулярных структур в клетках Chang liver превышает количество в клетках Hep G2, из чего можно сделать предположение, что, хотя в опухолевых клетках фукоидан в большей степени индуцирует апоптоз, у незлокачественных он в первую очередь вызывает аутофагию.

Таким образом, в результате было выяснено, что высокий молекулярный вес и полидисперсность фукоиданов не препятствуют их противоопухолевой активности. Различия в ингибирующем воздействии на клеточную пролиферацию нативного и частично гидролизованного образцов фукоидана не были статистически значимы. Фукоиданы интернализировались обоими типами клеток через эндоцитоз, причем немалигнизированные клетки Chang liver усваивали фукополисахариды быстрее, чем клетки гепатокарциномы Hep G2. Было показано, что обработка фукоиданами инициирует различные типы клеточной гибели: преимущественно аутофагию в немалигнизированных клетках, и апоптоз в опухолевых клетках [3].

Работа выполнена при финансовой поддержке «Курчатовского геномного центра – ПИЯФ» программой развития центров генетических исследований мирового уровня, Соглашение No. 075–15–2019–1663.

ЛИТЕРАТУРА

1. Журишкина Е.В., et al. 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
2. Журишкина Е.В., et al. 2017. Сравнительный анализ влияния фукоидана из водорослей *Fucus vesiculosus* и фракций, полученных из него с помощью анионообменной хроматографии, на клетки HeLa G-63, Hep G2 и Chang liver. Цитология. 59 (2): 148–155
3. Zhurishkina E.V., et al. The effect of polydisperse fucoidans from *Fucus vesiculosus* on Hep G2 and Chang liver cells // *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* – 2020, Vol. 21, pp. 100209