

УДК 577.114.15.593.95

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ ПРИМЕСЕЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ
В ОБРАЗЦАХ ФУКОИДАНА ИЗ БУРОЙ ВОДОРΟΣЛИ *FUCUS DISTICHUS*
SUBSP. *EVANESCENS* (С. AGARDH) Н.Т. POWELL, 1957, НА ЭМБРИОГЕНЕЗ
МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS*
(А. AGASSIZ, 1864) И ЭМБРИОТОКСИЧЕСКОЕ
ДЕЙСТВИЕ КУКУМАРИОЗИДА**

© 2021 г. М. И. Киселева¹, *, Т. И. Имбс¹, С. А. Авилон¹, И. Ю. Бакунина¹

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Владивосток 690022, Россия

*e-mail: mikiseleva@mail.ru

Поступила в редакцию 24.03.2020 г.

После доработки 18.08.2020 г.

Принята к публикации 05.10.2020 г.

На модели развивающихся эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* изучено влияние полифенольных примесей на биологическую активность образцов фукоидана из бурой водоросли *Fucus distichus* subsp. *evanescens*. Определена эмбриотоксическая активность фукофлоретола из *F. evanescens* (ИК₅₀ = 96.90 ± 12.20 мкмоль/л) и тритерпенового гликозида кукумариозида А₇ из кукумари *Cucumaria frondosa* subsp. *japonica* (ИК₅₀ = 0.39 ± 0.01 мкмоль/л). Показана способность фукоиданов с разным содержанием полифенольных примесей частично или полностью снижать эмбриотоксическую активность тритерпенового гликозида кукумариозида А₇ из *C. japonica*.

Ключевые слова: бурые водоросли, эмбрионы, морской еж, *Strongylocentrotus intermedius*, фукоидан, фукофлоретол, флоротаннины, тритерпеновые гликозиды, кукумариозид А₇

DOI: 10.31857/S0134347521040070

Фукоиданы представляют собой структурно разнообразное семейство сульфатированных, а иногда ацетилированных гомо- и гетерополисахаридов с остатками сульфатированной α-L-фукозы в основной цепи. Источником фукоидана являются преимущественно бурые водоросли. В последнее время фукоиданы стали объектом повышенного внимания и интенсивного исследования (Menshova et al., 2016). Практический интерес к этим полисахаридам можно объяснить их разнообразной биологической активностью и низкой токсичностью (Kusaykin et al., 2008; Luthuli et al., 2019). Многообразие структур фукоиданов является специфичным по отношению к виду водоросли и обусловлено различным соотношением типов О-гликозидных связей между остатками α-L-фукозы, количеством и расположением сульфатных и ацетатных групп, а также природой и расположением разветвлений (Li et al., 2008).

Помимо фукоиданов бурые водоросли синтезируют ряд уникальных вторичных метаболитов, в том числе полифенолы, которые также проявляют широкий спектр биологической активности

и действуют в малых концентрациях (Имбс, Звягинцева, 2018). Эти вещества часто экстрагируются вместе с фукоиданами, и не всегда удается освободиться от них во время процедуры очистки (Ragan, Glombitza, 1986). Присутствие примесей влияет на биологические свойства фукоидана и затрудняет оценку его биологической активности. Ранее нами было показано, что примесные фенолы играют ключевую роль в антиоксидантной активности, проявляемой фукоиданом из бурой водоросли *Fucus evanescens* (см.: Imbs et al., 2015).

Эмбрионы морского ежа являются удобной и чувствительной моделью для токсикологических, фармакологических и других биологических исследований (Бузников, Подмарев, 1975; Kobayashy, 1984). Цель настоящей работы – изучение влияния полифенольных примесей, содержащихся в образцах фукоидана бурой водоросли *Fucus distichus* subsp. *evanescens*, на развивающиеся эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* и на способность фукоиданов с разной степенью очистки от полифенольных примесей снижать эмбриотоксическую активность тритерпенового

гликозида кукумариозида A_7 из *Cucumaria frondosa* subsp. *japonica*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследований послужили образцы фукоиданов и фукофлоретол, выделенные из бурой водоросли фукуса, а также тритерпеновый гликозид кукумариозид A_7 , выделенный из кукумари. Во всех экспериментах использовали фильтрованную морскую воду.

Морских ежей собирали в б. Троицы (зал. Петра Великого Японского моря). Эксперименты проводили на Морской экспериментальной станции Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (Хасанский район, Приморский край, Россия). Бурые водоросли собирали в июле 2011 г. у западного побережья о-ва Итуруп (Охотское море; $44^{\circ}45'8''$ с.ш., $147^{\circ}10'5''$ в.д.) во время экспедиции на НИС “Академик Опарин”.

Свежий образец фукуса (800 г) промывали водой; затем удаляли механические примеси, обезжировали, выдерживая в 1 л 96% этанола (V/V) в течение 24 ч при температуре 40°C , и сушили в вакууме. В результате было получено 80 г сухой обезжиренной водоросли. Фукоидан экстрагировали из 40 г этой водоросли водным раствором 0.1 М HCl (pH 2–3) при температуре 60°C в течение 3 ч; экстракт центрифугировали, нейтрализовали и диализовали через мембрану “Thermo Scientific” (США), отсекая фракцию с молекулярной массой 3.5 кДа. Полисахарид осаждали из экстракта этанолом; выход полисахарида (F_0) составил 3.6 г.

Полисахарид F_0 делили на две порции. Первую порцию растворяли в воде (25 мг/мл), 60 мл загружали на колонку (3.0×14 см) с анионообменным носителем ДЭАЭ-целлюлоза в форме Cl^- . Нейтральные вещества элюировали водой, а затем линейным градиентом $\text{H}_2\text{O}/2\text{M NaCl}$ (250/250 мл). Фракцию фукоидана, элюированную 2М раствором NaCl, диализовали и лиофильно сушили. В результате получили 330 мг полисахарида F_1 . Вторую порцию полисахарида F_0 обрабатывали 5%-ным водным раствором H_2O_2 и 10%-ным водным раствором NH_3 доводили до pH 8.5, как описано ранее (Урванцева и др., 2004). Смесь оставляли в темноте на 17 ч при комнатной температуре. Нерастворимый осадок удаляли центрифугированием. Супернатант диализовали против воды и дважды осаждали этиловым спиртом, осадок центрифугировали и сушили сначала ацетоном, затем эфиром на воздухе. Полученный полисахарид F хроматографировали, как описано выше. Фракцию фукоидана, элюированную 2М раствором NaCl, диализовали и лиофильно сушили. В результате было получено 300 мг фукоидана F_2 .

В эксперименте использовали полифенольное соединение фукофлоретол, ранее выделенное нами из водно-этанольного экстракта бурой водоросли последовательно жидкостной экстракцией органическими растворителями и хроматографией на носителях: силикагель 100, полихром 1 и С-18. Соединение характеризовали методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Молекулярная масса фукофлоретола ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_9$) составила 374 Да, что соответствует трем единицам флороглюцина в полимерной молекуле (Silchenko et al., 2017; Imbs et al., 2018).

Подфракцию полярных кукумариозидов группы A_7 из кукумари получали методом тонкослойной хроматографии суммы гликозидов на силикагеле. Затем проводили разделение данной фракции методом обращенно-фазовой хроматографии на жидкостном хроматографе высокого давления. В работе использовали смесь гликозидов A_7 -1, A_7 -2 и A_7 -3 в соотношении 53.6, 6.4 и 21.3% соответственно (Дроздова и др., 1993).

Выход полисахаридов после хроматографии и содержание общих углеводов в образцах фукоидана, а также моносакхаридный состав и количество сульфатных групп в образцах полисахарида определяли, как описано ранее (Урванцева и др., 2004). Общее содержание полифенолов определяли по методу Фолина–Чокальтеу (Kuda, Ikemori, 2009) с использованием флороглюцина (“Merck”, США) в качестве стандарта. Содержание фенола выражали в миллиграммах эквивалента флороглюцина на 1 г сухого вещества (мгPGEq/гDW).

Оптическое вращение водных растворов полисахаридов ($[\alpha]_D^{20}$, 1 мг/мл) измеряли на поляриметре “Perkin-Elmer 141” (Германия) на натриевой лампе при длине волны 580 нм. УФ-спектры поглощения образцов фукоидана регистрировали на спектрофотометре Cecil CE 7200 “Hitachi” (США).

Спектры флуоресценции образцов фукоидана регистрировали на спектрофлуориметре “Hitachi-850” (Япония) в диапазоне от 380 до 600 нм, используя возбуждение при 366 нм, в кварцевой кювете с толщиной слоя 1 см. Спектры корректировали по родамину В и записывали в режиме интеграции. Площади под спектрами флуоресценции образцов полисахарида рассчитывали, вычитая площадь под спектром буферного раствора из общей площади спектра. Ширина щели на монохроматорах возбуждения и излучения составляла 5 нм, скорость записи спектров – 100 нм/мин.

^{13}C ЯМР-спектры полисахаридов регистрировали на ЯМР-спектрометре “Avance DPX-700” (Bruker, Германия) (60°C , D_2O). ЯМР-спектры полифенольных соединений регистрировали на ЯМР-спектрометре “Avance-III 500 HD” (Bruker, Германия) при температуре 35°C в дейтерирован-

ном метаноле (MeOD). В качестве внутреннего стандарта в обоих случаях использовали тетраметилсилан.

Мужские и женские гаметы морского ежа получали, а также проводили оплодотворение особей морского ежа в соответствии с известными методиками с некоторыми модификациями (Бузников, Подмарев, 1975; Киселева и др., 2005, 2015). Свежевыловленных морских ежей при помощи механического встряхивания разделяли на самцов и самок, которых содержали в отдельных емкостях. Яйцеклетки и спермии собирали в разные стаканы с морской водой, пропускали через сита (размер ячеек 100×100 мкм), давали осесть на дно заполненной емкости и дважды промывали морской водой, чтобы смыть желеобразное покрытие яйца. Перед началом опытов проводили пробное оплодотворение. В экспериментах использовали яйцеклетки со степенью оплодотворения не менее 98%. Время от получения яйцеклеток до их осеменения не превышало 1 ч. Все опыты проводили одновременно в 12-луночных планшетах компании ООО “БиолоТ” (Россия) на одних и тех же партиях эмбрионов при температуре $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

При оценке влияния фукоиданов F_0 , F_1 и F_2 на эмбриогенез морского ежа к 0.9 мл суспензии (2500/мл) яйцеклеток через 3–5 мин после оплодотворения добавляли 0.1 мл раствора испытуемых веществ в морской воде. Конечная концентрация фукоиданов в инкубационной смеси составляла 10, 50, 100, 250, 500 и 1000 мкг/мл. Через каждые трое суток инкубации ко всем пробам добавляли по 0.5 мл морской воды для поддержания необходимого уровня кислорода.

В параллельных экспериментах к яйцеклеткам через 3–5 мин после оплодотворения добавляли кукумариозид A_7 и фукофлоретол в исследуемых концентрациях. Конечная концентрация кукумариозидов A_7 в инкубационной смеси составляла 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 1.2, 2.5, 5.0 и 10.0 мкг/мл, а фукофлоретол — 10, 20, 30, 40 и 50 мкг/мл. Инкубационная смесь содержала 0.1 мл раствора фукофлоретол (не более 10% метанола в морской воде) или 0.1 мл раствора гликозида (не более 10% этанола в морской воде) и 0.9 мл суспензии оплодотворенных яйцеклеток (2500/мл). Оплодотворенные яйцеклетки с испытуемыми веществами инкубировали в течение 48 ч до стадии плутеуса — 24–25-я стадии (по: Бузников, Подмарев, 1975).

При изучении совместного действия фукоиданов F_1 , F_2 и кукумариозидов A_7 на эмбриогенез морского ежа исследуемые образцы добавляли на стадии зиготы к суспензии оплодотворенных яйцеклеток (2500/мл) последовательно: фукоидан — через 3–5 мин после оплодотворения, кукумариозид A_7 — через 30 мин инкубации оплодотворенных яйцеклеток с фукоиданом. Инкубационная

смесь состояла из 0.8 мл суспензии яйцеклеток и из растворов фукоидана и кукумариозидов A_7 (по 0.1 мл).

За развитием эмбрионов во всех экспериментах наблюдали в микроскоп “Motic AE 21” (Китай), визуально определяя основные признаки и стадию развития (по: Бузников, Подмарев, 1975), вплоть до гибели всех эмбрионов. В качестве контроля использовали эмбрионы в морской воде. Стандартными критериями для положительной оценки действия веществ были синхронность деления яйцеклеток, нормальное функционирование эмбрионов, а также их подвижность и жизнеспособность. Цитотоксическое действие соединений оценивали по их способности вызывать блокаду или тормозить деление оплодотворенных яйцеклеток. Кроме этого на стадиях эмбрионального развития морских ежей регистрировали различные аномалии, замедленное или вращательное движение эмбрионов (Kobayashi, 1984; Kobayashi, Okamura, 2002), а также определяли концентрацию, вызывающую гибель 50% эмбрионов ($ИК_{50}$). Выживаемость эмбрионов оценивали как отношение времени их жизни под действием веществ (сут) ко времени жизни в контрольном эксперименте (сут), выраженное в процентах. Все эксперименты выполняли одновременно в одинаковых условиях с использованием одной партии эмбрионов в 5–10 параллельных опытах с тремя повторами для каждой концентрации веществ.

Достоверность результатов в условиях заданной доверительной вероятности $p \leq 0.05$ оценивали с помощью методов дисперсионного анализа ANOVA в пакете прикладных программ Origin 8.1; анализировали кривые доз-зависимости и выбирали модели для определения $ИК_{50}$ также с помощью программного обеспечения Origin 8.1 (“OriginLab”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика образцов фукоидана

Образец фукоидана F_0 имел УФ-спектр поглощения с максимумом при 268 нм (рис. 1, спектр 1), что характерно для ароматических соединений. Максимум спектра возбуждения образца фукоидана F_0 располагался при 366 нм (рис. 1, спектр 2). Спектр флуоресценции этого образца имел широкий максимум в диапазоне 450–455 нм и плечо в диапазоне 530–550 нм (рис. 1, спектр 3). По данным метода Фолина–Чокальтеу (Kuda, Ikemori, 2009), этот образец содержал 33.3 мг PGEq/gDW полифенольных соединений (табл. 1). Степень очистки образца F_0 $m = 0$ (табл. 2).

Фукоидан F_1 , полученный после анионообменной хроматографии исходного полисахарида

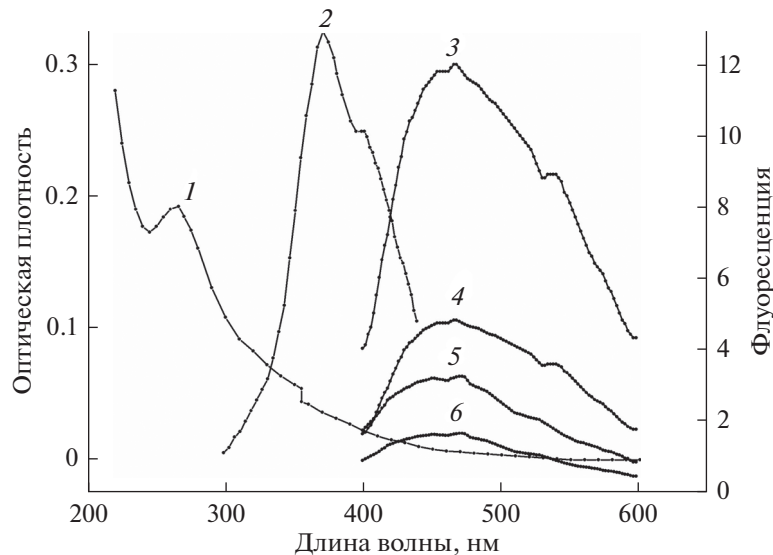


Рис. 1. Спектры поглощения (1), возбуждения (2) и флуоресценции (3) фукоидана F_0 ; спектры флуоресценции фукоиданов разной степени очистки от полифенольных примесей: F_1 (4), F (5) и F_2 (6). Концентрация образцов 5 мг/мл, 0.1 М Na^+ -фосфатный буфер, pH 8.5; кювета 1 см, возбуждение светом с длиной волны 366 нм, ширина щели на монохроматорах возбуждения и излучения – 5 нм.

F_0 , также имел спектр флуоресценции (рис. 1, спектр 4), но его интенсивность была меньше. Этот образец содержал 20 мгPGEq/gDW полифенольных соединений (табл. 1). Степень очистки образца F_1 $m = 0.60$ (табл. 2).

Фукоидан F_0 был обработан 5%-ным водным раствором H_2O_2 , и была получена фракция полисахарида F , в которой еще сохранялась флуоресценция (рис. 1, спектр 5). В результате хроматографии фукоидана F на анионообменном носителе получен фукоидан F_2 с нулевой флуоресценцией (рис. 1, спектр 6). Согласно данным метода Фолина–Чокальтеу (Kuda, Ikemori, 2009), фукоидан F_2 не содержал полифенольные примеси (табл. 1). Степень очистки образца F_2 $m = 0.98$ (табл. 2).

По данным ЯМР спектроскопии структуры фукоиданов F_1 и F_2 были подобны и представляли собой сульфатированный α -L-фукан, имеющий линейную цепь чередующихся (1 → 3)- и (1 → 4)-связанных остатков α -L-фукопиранозы, сульфатированных по C2 и C4 (1 → 3)- α -L-фукопира-

нозных остатков (спектры не приводятся) (Урванцева и др., 2004). Фукоидан F_2 был освобожден от примесей полифенольных соединений ($m = 0.98$), показатель оптического угла вращения $[\alpha]_D^{20}$ (–173.0) соответствовал таковому ранее охарактеризованного фукоидана из *F. evanescens* (табл. 2) (Bilan et al., 2002).

Влияние образцов фукоидана F_0 , F_1 и F_2 на эмбриогенез морского ежа

При низкой концентрации фукоидана F_0 (10–50 мкг/мл) выживаемость эмбрионов морского ежа по сравнению с таковой в контроле (рис. 2а; табл. 3) увеличивалась. При повышении концентрации этого фукоидана наблюдались асинхронное деление, аномалии и частичная гибель эмбрионов, что сопровождалось лизисом бластомеров. Через 0.5 сут инкубации фукоидан F_0 в концентрации 500 мкг/мл вызывал гибель и лизис 30% эмбрионов, а в концентрации 1000 мкг/мл –

Таблица 1. Основные характеристики образцов полисахарида разной степени очистки

Образец	Выход, %	Фолин–Чокальтеу, мгPGEq/gDW	Сульфатные группы, %	Состав нейтральных моносахаридов, %				
				Fuc	Man	Gal	Glc	Xyl
F_0	100	33.3	14.3	59.4	3.2	7.2	25.0	5.7
F_1	Не определяли	20.0	28.0	91.5	0	3.0	0	0.5
F_2	38	0	31.4	94.6	0.3	4.2	0	0.9

Примечание. Fuc – фукоза, Man – манноза, Gal – галактоза, Glc – глюкоза, Xyl – ксилоза.

Таблица 2. Спектральные характеристики образцов фукоидана

Образец	ОП ₃₆₆ *	$[\alpha]_D^{20}, \text{H}_2\text{O}$	$m = 1 - S/S_0$
F ₀	0.285	-114.8	0
F ₁	0.114	—	0.60
F ₂	0.015	-173.0	0.98

*Кювета – 1 см, концентрация полисахарида 2 мг/мл. Примечание. S – площадь под спектром флуоресценции исследуемых образцов очищенного фукоидана; S_0 – площадь под спектром флуоресценции исходного образца фукоидана F₀; ОП₃₆₆ – оптическая плотность раствора полисахарида при 366 нм; m – степень очистки.

гибель 80% эмбрионов (табл. 3; рис. 2) на стадии одного бластомера (рис. 3Аа), часть которых была лизирована.

При действии фукоидана F₁ (степень очистки $m = 0.60$) в концентрации 500–1000 мкг/мл через 0.5 сут инкубации эмбрионы начинали делиться асинхронно, а через 1.5 сут появились эмбрионы с морфологическими аномалиями, отстававшие в развитии (табл. 3; рис. 2б и рис. 3Б: а, б).

Фукоидан F₂ через 0.5 сут инкубации во всех исследованных концентрациях оказывал положительное влияние на развивающиеся эмбрионы. При его действии в концентрации 100–250 мкг/мл наблюдалось как опережение в развитии, так и увеличение продолжительности жизни эмбрионов на 30–50% относительно контрольных зародышей (табл. 3; рис. 2в). Однако при концентрации фукоидана F₂ 500–1000 мкг/мл появлялись аномалии в развитии эмбрионов на стадии раннего плутеуса (рис. 3Б: г), что соответствует 22–23-й стадиям (по: Бузников, Подмарев, 1975) (табл. 3; рис. 3А: в, г).

Фукоиданы F₀ и F₁ с разной степенью загрязнения полифенолами, а также образец F₂, очищенный от полифенолов, в низких концентрациях (10–50 мкг/мл) повышали выживаемость эмбрионов. Различие наблюдалось при более высоком содержании этих полисахаридов. Так, при концентрации фукоидана F₀ 100–1000 мкг/мл отмечена частичная или полная гибель эмбрионов. Фукоиданы F₁ и F₂ в этой же концентрации не оказывали губительного действия на жизнеспособность эмбрионов (рис. 2). Однако в присутствии фукоидана F₁ увеличилось число аномальных эмбрионов на всех стадиях развития (табл. 3; рис. 3Б), что наглядно представлено на фотографиях эмбрионов через 3 сут инкубации (рис. 4). При концентрации фукоидана F₂ 100 мкг/мл эмбрионы развивались без морфологических нарушений (рис. 4). Действие фукоидана F₁ в этой же концентрации проявлялось как аномалии в развитии эмбрионов, а при концентрации 1000 мкг/мл через 3 сут инкубации отмечено отставание в развитии эмбрионов и увеличение числа аномалий.

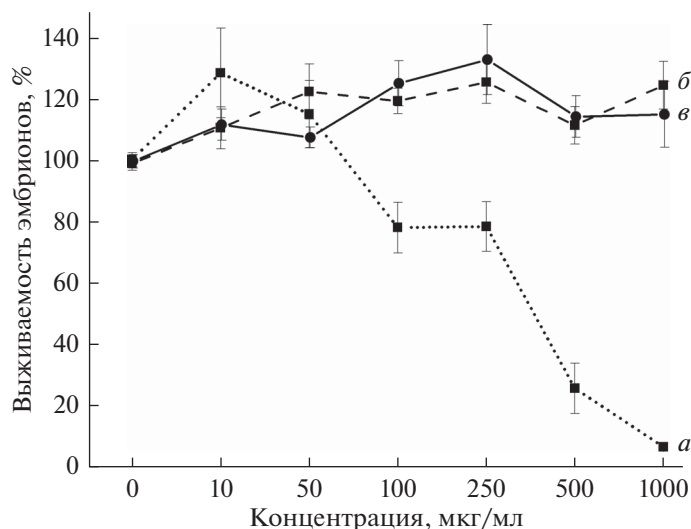


Рис. 2. Влияние фукоиданов с разной степенью очистки от полифенолов на эмбриогенез морского ежа: а – F₀; б – F₁; в – F₂. Результаты представлены в виде графиков зависимости средних значений выживаемости эмбрионов от концентраций полисахаридов ± стандартная ошибка среднего (вертикальные линии) при доверительной вероятности $p \leq 0.05$.

Таблица 3. Влияние образцов фукоидана разной степени очистки на развивающиеся эмбрионы морского ежа

Образец фукоидана	Концентрация, мкг/мл	Время инкубации после оплодотворения, сут			
		0.5	1.5	3	4
контроль	0	10–11	22–23	24–25, ан. (д, е) 10%, д.з. Г 50%	24–25, ан. (е, ж) 10%, д.з. Г 50%
F ₀	10–50*	10–11	22–23, ан. (в) 20%	24–25, ан. (д, е) 20%, д.з. 50%	25, ан. (е, ж), д.з., крут. 50%, Г 5%
	100–250	9 < 10 > 11	22–23, ан. (в) 30%, Г 30%	24–25, ан. (д, е), д.з. 50%, Г 30%	25, ан. (е, ж), д.з., крут. 50%, Г 45%
	500	3–4 < 8–10 > 11–12, ан. 30%, Г, Л 30%	19–23, д.з. ан. (а, б, г), Г, Л 60%	Г	Г
	1000	3–4, ан., Г 80% (1 бл.), Л (черный) 30%	Г	Г	Г
F ₁	10–50	10–11 > 12	22–23	24–25, Г 10%	25, ан. (д, е, ж), д.з. 70%, крут. 30%, Г 5%
	100	10–11 > 12	22–23	24–25, ан. (д, е), д.з. 20%, Г 10%	24–25, ан. (д, е, ж), д.з., 70%, крут. 30%, Г 10%
	250	10–11 > 12	22–23	23–25, ан. (г, д), д.з., Г 10%	24–25, ан. (д, е, ж), д.з., крут. 30%, Г 10%
	500	9 < 10–11 > 12	19–23, ан. (а, б), д.з. 20%	23–24, ан. (г, д), д.з., Г 20%	24–25, ан. (д, е, ж), д.з., 70%, крут. 30%, Г 30%
	1000	9 < 10–11 > 12	18–22, ан. (а, б), д.з. 30%	22–24, ан. (б, г, д), д.з., Г 30%	22–24, ан. (б, г, д, е, ж), д.з., Г 40%
F ₂	10–50	10–11 > 12	23–24	24–25	25, ан. (е, ж), д.з. 50%, крут. 10%
	100–250	11–12	22–24	24–25	25–26, ан. (е, ж, з) 50%, крут. 30%, Г 30%
	500	10–11 > 12	22–23, ан. (в), д.з. 10%	23–25, ан. (в), д.з. 10%, Г 10%	24–25, ан. (е, ж, з) 50%, крут. 15%, Г 10%
	1000	10–11 > 12	21–22, ан. (в), д.з. 20%	22–25, ан. (в), д.з. 25%, Г 15%	24–25, ан. (е, ж, з) 50%, крут. 15%, Г 15%

*В пределах обозначенного диапазона концентрации результаты действия фукоиданов не изменялись.

Примечание. Контроль – эмбрионы в морской воде; F₀ – образец фукоидана в природном комплексе с полифенолами; F₁ – образец фукоидана в природном комплексе с полифенолами; F₂ – образец фукоидана, освобожденный от полифенольных примесей. Стадии развития: 3 – 2 blastomera, 4 – 4 blastomera; 8, 9 – ранняя blastula 1 и 2 соответственно; 10, 11 – средняя blastula 1 и 2 (выупление) соответственно; 12 – поздняя blastula 1; 15 – ранняя gastrula 2; 18, 19 – поздняя gastrula 1 и 2 соответственно; 20, 21 – призма 1 и 2 соответственно; 22, 23, 24 – ранний плутеус 1, 2 и 3 соответственно; 25, 26 – средний плутеус 1 и 2 соответственно (Бузников, Подмарев, 1975); Г – гибель яйцеклеток; Л – лизис яйцеклеток. Условные обозначения: ан. – аномальное развитие эмбрионов; а, б, в, г, д, е, ж, з – аномальные стадии, как на рис. 3; бл. – blastomer, д.з. – движение эмбрионов замедленное; крут. – крутящиеся эмбрионы. Приведены результаты пяти экспериментов, доверительный интервал $p \leq 0.05$.

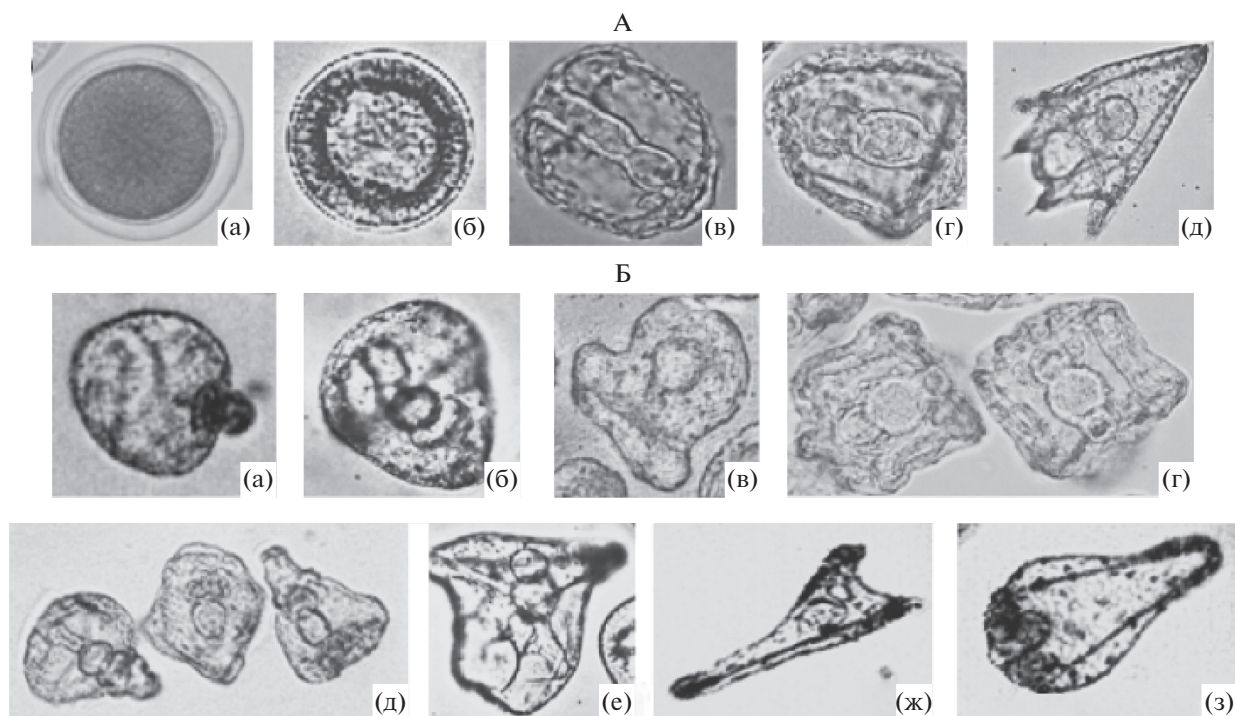


Рис. 3. Эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* на разных стадиях развития. А — нормальное развитие эмбрионов: а — оплодотворенная яйцеклетка (1 бластомер), б — бластула (10-я стадия), в — призма (21-я стадия), г и д — ранний и средний плутеус (23-я и 25-я стадии соответственно). Б — аномалии в развитии эмбрионов, отмеченные на стадиях: а, б — гастролы (16–19-я стадии), в — призмы (21-я стадия) и г, д, е, ж, з — раннего и среднего плутеуса (22–26-я стадии); номер стадии по: Бuzников, Подмарев (1975). Ув. $\times 40$.

При этой же концентрации фукоидана F_2 аномалий в развитии эмбрионов не наблюдалось, но отмечено отставание в их развитии (табл. 3; рис. 4).

Действие фукофлоретола и кукумариозида A_7 на эмбриогенез морского ежа

В концентрации ≥ 50 мкг/мл полифенол блокировал деление и вызывал лизис яйцеклеток на стадии 1 бластомера. В концентрации < 50 мкг/мл (134 мкмоль/л) фукофлоретол ингибировал развитие эмбрионов частично, что проявлялось в течение всего инкубационного периода.

Кукумариозид A_7 оказывал цитотоксическое действие в концентрации ≥ 1.2 мкг/мл (0.79 мкмоль/л). Влияние гликозида в концентрации < 1.2 мкг/мл приводило к задержке развития, частичной гибели и морфологическим нарушениям в развитии эмбрионов (рис. 3Б: в), тогда как в концентрации 0.2 мкг/мл это соединение оказывало слабое стимулирующее действие (рис. 5б, рис. 6). Значения $ИК_{50}$ для фукофлоретола и кукумариозида A_7 составили 96.9 ± 12.2 и 0.39 ± 0.01 мкмоль/л соответственно (рис. 5в, г).

Совместное действие фукоиданов F_1 , F_2 и кукумариозида A_7 на эмбриогенез морского ежа

Фукоиданы F_1 и F_2 в исследованных концентрациях снимали токсическое действие кукумариозида A_7 на развивающиеся эмбрионы морского ежа (рис. 6), за исключением кукумариозида A_7 в концентрации 0.6 мкг/мл, при которой фукоидан F_1 практически не оказывал защитного действия. Наиболее эффективно эмбрионы морского ежа защищал фукоидан F_2 в концентрациях 100–250 мкг/мл (рис. 6а).

В данном исследовании мы привели результаты изучения биологических свойств образцов фукоидана F_0 , F_1 и F_2 из бурой водоросли *F. evanescens*, которые имеют одинаковую структуру, но различаются по степени загрязнения полифенольными соединениями, образующими с полисахаридом прочный комплекс. Очистка полисахарида заключалась в разрушении данного комплекса под действием перекиси водорода и в последующей хроматографии на анионообменном носителе. Степень загрязнения образцов фукоидана полифенольными соединениями контролировали методом флуоресценции самих соединений (Урванцева и др., 2004) и колориметрическим методом Фолина—Чокальтеу (Kuda, Ikemori, 2009). Результаты, полученные с по-

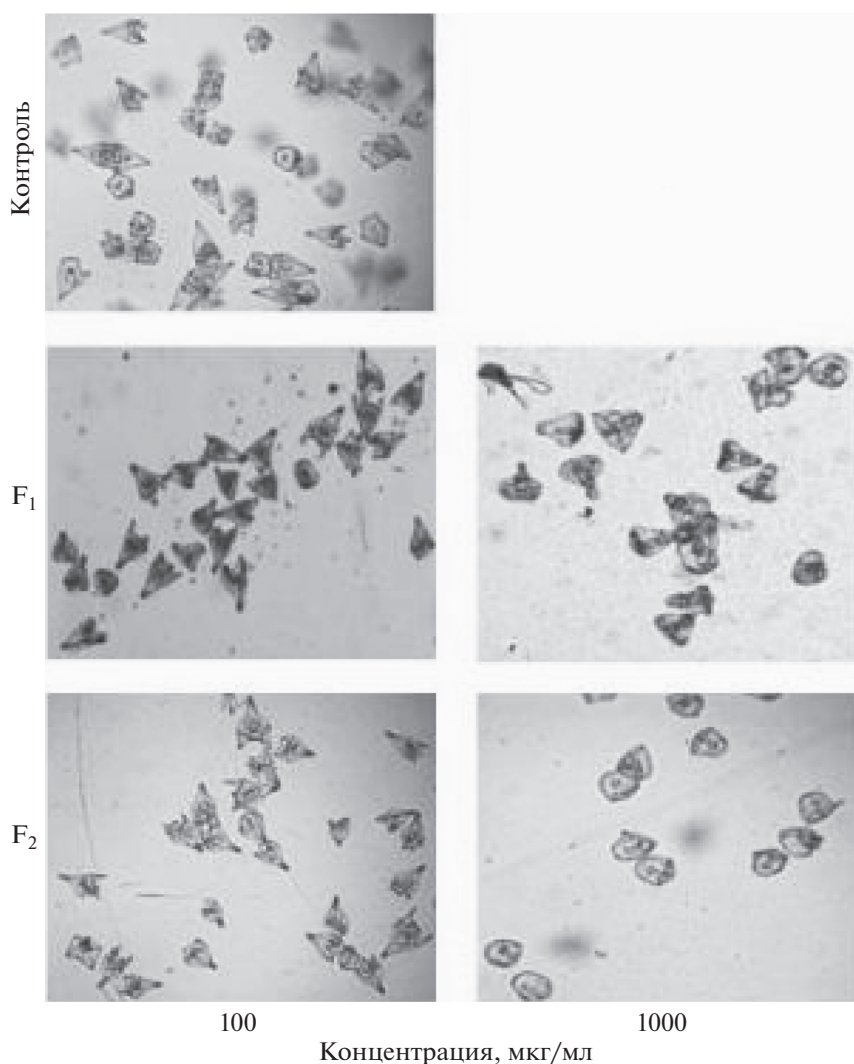


Рис. 4. Влияние фукоиданов F_1 и F_2 в концентрациях 100 и 1000 мкг/мл на развивающиеся эмбрионы морского ежа через трое суток инкубации. Контроль – эмбрионы в морской воде. Ув. $\times 10$.

мощью этих методов, хорошо согласуются. Однако простой и высокочувствительный метод собственной флуоресценции позволяет без дополнительных реагентов и разрушения структуры полисахарида выявить присутствие полифенольных соединений. Этот метод очень удобен для контроля очистки полисахаридов от любых флуоресцирующих примесей.

Для изучения биологической активности полисахаридов нами давно и успешно применяется модель развивающихся эмбрионов морского ежа. В наших ранних исследованиях показано, что полисахариды бурых водорослей независимо от моносахаридного состава увеличивали продолжительность жизни эмбрионов (Киселева и др., 2005, 2015; Kiseleva et al., 2008). Степень очистки полисахаридов от полифенольных примесей в данных исследованиях не контролировали. В настоящей работе исследовали влияние на эмбрио-

генез морского ежа одного фукоидана, но с разным содержанием полифенольных примесей (образцы F_1 и F_2) (табл. 1). Сырой образец фукоидана F_0 был гетерогенным по моносахаридному составу и содержал наибольшее количество полифенолов (33.3 мгPGEq/гDW, степень очистки $m = 0$). В концентрациях ≥ 100 мкг/мл этот образец проявлял высокую эмбриотоксическую активность (рис. 2a). Цитотоксический эффект очищенного образца фукоидана F_1 (20.0 мгPGEq/гDW, $m = 0.6$) наблюдался лишь при концентрациях 500 и 1000 мкг/мл. Наиболее благоприятным для жизнедеятельности эмбрионов оказался образец фукоидана F_2 , очищенный от полифенольных примесей. Этот образец, как и образец фукоидана F_1 , поддерживал и удлинял жизнь эмбрионов, а также, что очень важно, предупреждал появление аномалий в их развитии. Фукофлоретол – полифе-

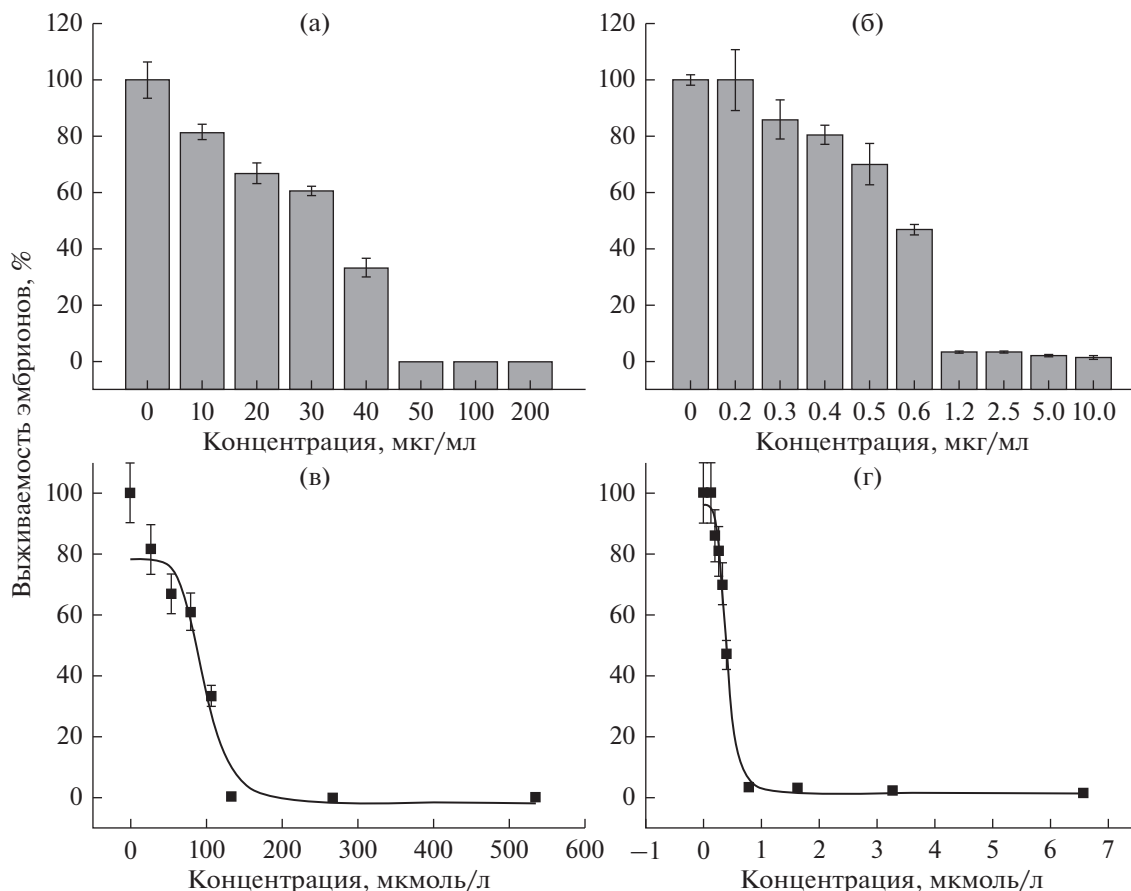


Рис. 5. Цитотоксическое действие фукофлоритола (а) и кукумариозида А₇ (б) на развивающиеся эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*, а также сигмоидальная доз-зависимость выживаемости эмбрионов для определения ИК₅₀ фукофлоритола (в) и кукумариозида А₇ (г). В результате подгонки теоретических зависимостей к экспериментальным точкам по модели Хилла определены коэффициенты нелинейной регрессии k и n , соответствующие ИК₅₀ и коэффициенту кооперативности, который отражает число мест связывания лиганда. Вертикальные линии на рисунках (а) и (б) отражают стандартную ошибку среднего, тогда как на рисунках (в) и (г) — стандартную ошибку подгонки теоретической кривой к экспериментальным точкам.

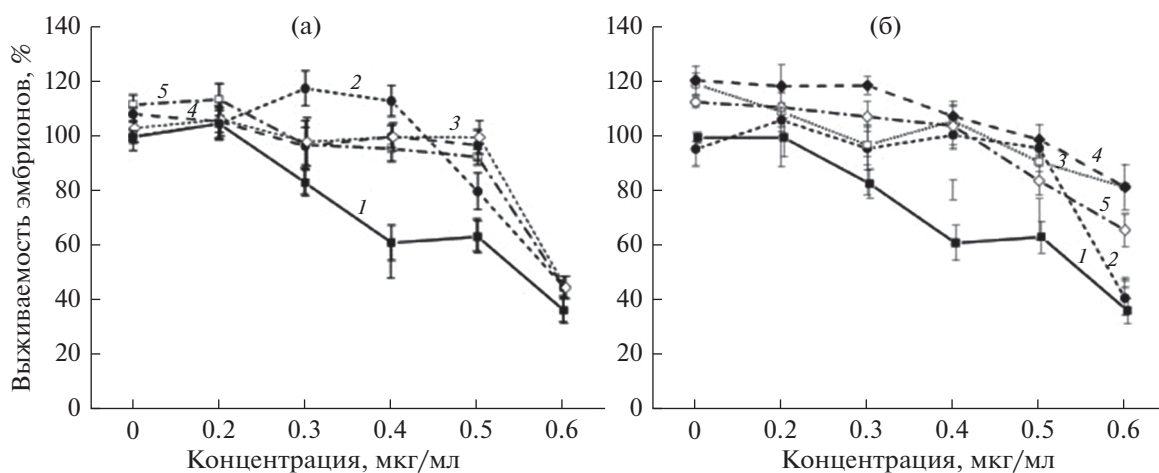


Рис. 6. Совместное действие фукоиданов и тритерпенового гликозида кукумариозид А₇. а — фукоидан F₁ ($m = 0.60$); б — фукоидан F₂ ($m = 0.98$). 1 — кукумариозид А₇; 2 — 10 мкг/мл фукоидана + кукумариозид А₇; 3 — 50 мкг/мл фукоидана + кукумариозид А₇; 4 — 100 мкг/мл фукоидана + кукумариозид А₇; 5 — 250 мкг/мл фукоидана + кукумариозид А₇. Результаты представлены в виде графиков зависимости средних значений выживаемости эмбрионов от концентраций кукумариозида ± стандартная ошибка среднего (вертикальные линии) при доверительной вероятности $p \leq 0.05$.

нольное соединение, выделенное из этой же водоросли, оказывал цитотоксическое действие в концентрациях ≤ 50 мкг/мл; ИК₅₀ = 96.9 ± 12.2 мкмоль/л (рис. 5а, б).

Ранее на модели развивающихся эмбрионов морского ежа нами было показано, что фукоиданы снижают токсическое действие ингибиторов белковой природы из бурой водоросли *Saccharina cichorioides* (см.: Киселева и др., 2015), однако содержание полифенольных примесей в образцах белков и полисахаридов не определялось. В качестве токсина мы выбрали кукумариозид А₇ из голотурии *S. frondosa*, известный как соединение, ингибирующее и блокирующее деление яйцеклеток в наномолярных концентрациях (Agafonova et al., 2003). В нашем эксперименте кукумариозид А₇ также показал высокую цитотоксическую активность (ИК₅₀ = 0.39 ± 0.01 мкмоль/л). При предварительной обработке эмбрионов образцами фукоидана F₁ и F₂ токсическое действие этого соединения различалось. Особенно заметное различие защитных свойств фукоиданов F₁ и F₂ было отмечено при высоких концентрациях кукумариозида А₇ (0.6 мкг/мл) и полисахарида (100 и 250 мкг/мл). Наиболее эффективную защиту оказывал высокоочищенный образец фукоидана F₂ (степень очистки $m = 0.98$) (рис. 6б, линии 4 и 5): выживаемость эмбрионов в его присутствии увеличилась по сравнению с таковой в контроле и при действии фукоидана F₁ (рис. 6а, линии 4 и 5) более чем на 40%.

Таким образом, на модели развивающихся эмбрионов морского ежа было показано, что лишь полностью очищенный от полифенольных примесей образец фукоидана (F₂) из бурой водоросли *F. distichus* стимулировал эмбриогенез и эффективно защищал эмбрионы от токсического действия кукумариозида А₇. Полифенольные примеси негативно влияли на биологическую активность образцов фукоидана, вызывая появление большого количества эмбрионов с морфологическими нарушениями. Образец фукоидана (F₁), содержащий полифенолы, не снижал эмбриотоксическое действие высоких концентраций кукумариозида А₇. В связи с этим следует отметить, что при изучении биологических свойств фукоиданов необходимо контролировать количество примеси полифенольных соединений, которые можно легко обнаружить при измерении спектра флуоресценции образца полисахарида.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-00591.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем искреннюю признательность сотрудникам Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН к.б.н. А.В. Скрипцовой за идентификацию бурых водорослей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бузников Г.А., Подмарев В.К. Морские ежи *Strongylocentrotus drobachiensis*, *S. nudus*, *S. intermedius* // Объекты биологии развития. М.: Наука. 1975. С. 178–216.
- Дроздова О.А., Авиллов С.А., Калиновский А.И. и др. Три-сульфатированные гликозиды из голотурии *Cucumaria japonica* // Химия природ. соедин. 1993. № 3. С. 369–374.
- Имбс Т.И., Звягинцева Т.Н. Флоротаннины – полифенольные метаболиты бурых водорослей // Биол. моря. 2018. Т. 44. № 4. С. 217–227.
- Киселева М.И., Шевченко Н.М., Крупнова Т.Н., Звягинцева Т.Н. Влияние фукоиданов на развивающиеся эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2005. Т. 41. № 1. С. 51–57.
- Киселева М.И., Ермакова С.П., Звягинцева Т.Н. Действие белков и полисахаридов бурых водорослей на оплодотворение яйцеклеток и развитие эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* A. Agassiz, 1863 // Биол. моря. 2015. Т. 41. № 6. С. 437–446.
- Урванцева А.М., Бакунина И.Ю., Ким Н.Ю. и др. Выделение очищенного фукоидана из природного комплекса с полифенолами и его характеристика // Химия растит. сырья. 2004. № 3. С. 15–24.
- Agafonova I.G., Aminin D.L., Avilov S.A., Stonik V.A. Influence of cucumariosides upon intracellular $[Ca^{2+}]_i$ and lysosomal activity of macrophages // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 24. P. 6982–6986.
- Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E. et al. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. № 8. P. 719–730.
- Imbs T.I., Skriptsova A.V., Zvyagintseva T.N. Antioxidant activity of fucose-containing sulfated polysaccharides obtained from *Fucus evanescens* by different extraction methods // J. Appl. Phycol. 2015. V. 27. № 1. P. 545–553.
- Imbs T.I., Silchenko A.S., Fedoreev S.A. et al. Fucoidanase inhibitory activity of phlorotannins from brown algae // Algal Res. 2018. V. 32. № 1. P. 54–59.

- Kiseleva M.I., Balabanova L.A., Rasskazov V.A., Zvyagintseva T.N.* Effect of 1,3;1,6- β -D-glucans on developing sea urchin embryos // *Mar. Biotechnol.* 2008. V. 10. № 4. P. 466–470.
- Kobayashi N.* Marine ecotoxicological testing with echinoderms. In *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment (Proc. International Symposium on Ecotoxicological Testing for the Marine Environment, Ghent, Belgium, September 12–14, 1983)*, Persoone G., Jaspers E., Claus C., Eds., Bredene, Belgium: State Univ. of Ghent, 1984. V. 1. P. 341–405.
- Kobayashi N., Okamura H.* Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin // *Mar. Pollut. Bull.* 2002. V. 44. № 8. P. 748–751.
- Kuda T., Ikemori T.* Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan // *Food Chem.* 2009. V. 112. № 3. P. 575–581.
- Kusaykin M., Bakunina I., Sova V. et al.* Structure, biological activity, and enzymatic transformation of fucoidans from the brown seaweeds // *Biotechnol. J.* 2008. V. 3. № 7. P. 904–915.
- Li B., Lu F., Wei X., Zhao R.* Fucoidan: structure and bioactivity // *Molecules.* 2008. V. 13. № 8. P. 1671–1695.
- Luthuli S., Wu S., Cheng Y. et al.* Therapeutic effects of fucoidan: A review on recent studies // *Mar. Drugs.* 2019. V. 17. Art. ID 487. <https://doi.org/10.3390/md17090487>
- Menshova R.V., Shevchenko N.M., Imbs T.I. et al.* Fucoidans from brown alga *Fucus evanescens*: structure and biological activity // *Front. Mar. Sci.* 2016. V. 3. Art. ID 129. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00129>
- Ragan M.A., Glombitza K.W.* Phlorotannins, brown alga polyphenols // *Progress in Phycological Research* / Eds.: *F.E. Round, D.J. Chapman.* Bristol, U.K.: Biopress. 1986. V. 4. P. 129–241.
- Silchenko A.S., Imbs T.I., Zvyagintseva T.N. et al.* Brown alga metabolites – inhibitors of marine organism fucoidan hydrolases // *Chem. Nat. Compd.* 2017. V. 53. № 2. P. 345–350.

Effects of Polyphenolic Impurities in Fucoidan Samples from the Brown Alga *Fucus distichus* subsp. *evanescens* (C. Agardh) H.T. Powell, 1957 on the Embryogenesis in the Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius* (A. Agassiz, 1864) and on the Embryotoxic Action of Cucumarioside

M. I. Kiseleva^a, T. I. Imbs^a, S. A. Avilov^a, and I. Yu. Bakunina^a

^a*G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia*

Effects of polyphenolic impurities on the biological activity of fucoidan samples from the brown alga *Fucus distichus* subsp. *evanescens* was studied using the model of developing embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. The embryotoxic action of fucophloretol from *F. evanescens* ($IC_{50} = 96.90 \pm 12.20 \mu\text{mol/L}$) and cucumarioside A₇ (a triterpene glycoside) from *Cucumaria frondosa* subsp. *japonica* ($IC_{50} = 0.39 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$) was assessed. The ability of fucoidans with different levels of polyphenolic impurities to partially or completely reduce the embryotoxic action of cucumarioside A₇ from *C. japonica* is shown.

Keywords: brown algae, embryos, sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*, fucoidan, fucophloretol, phlorotannins, triterpene glycosides, cucumarioside A₇