

УДК 616-006-085. 322:582.272:577.14

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЭФФЕКТЫ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ИЗ МОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

© 2013 г. Т.С. Запорожец¹, С.В. Ермакова²,
Т.Н. Звягинцева², Н.Н. Беседнова¹

¹Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии” СО РАМН, Владивосток

²Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН Владивосток

E-mail: niiem_vl@mail.ru

Изложены современные представления о механизмах противоопухолевого действия сульфатированных полисахаридов из морских водорослей. Показано антипролиферативное, проапоптотическое, антиангиогенное действие этих биополимеров. В сжатой форме представлены собственные материалы авторов, полученные при исследовании противоопухолевого действия фукоиданов из бурых водорослей дальневосточных морей. Литературные источники и собственные наблюдения авторов обзора позволяют считать, что сульфатированные полисахариды морских водорослей могут стать основой для разработки лекарственных препаратов нового поколения с противоопухолевым эффектом.

Ключевые слова: сульфатированные полисахариды, фукоидан, противоопухолевая активность, водоросли.

ВВЕДЕНИЕ

Перспективным источником оригинальных лекарственных средств, направленных на профилактику и лечение злокачественных новообразований, являются морские водоросли и выделяемые из них углеводные биополимеры, обладающие широким спектром фармакологических эффектов и низкой токсичностью (Запорожец, 2006; Запорожец, Беседнова, 2007; Усов, Билан, 2009; Хотимченко, 2010; D’Ayala et al., 2008; Collen et al., 2009; Yang et al., 2009).

К настоящему времени накоплен большой объем информации о возможности использования сульфатированных полисахаридов (СПС) водорослей для регуляции различных биохимических и физиологических процессов. Эти вещества стали предметом пристального внимания исследователей во всем мире (Wu, Chen, 2006; Lins et al., 2008; Nakayasu et al., 2009; Khanavi et al., 2010; Synytsya et al., 2010; Huamao et al., 2011; Ikeguchi et al., 2011; Wijesekara et al., 2011).

Несмотря на то, что первые публикации о биологической активности фукоиданов относятся к концу прошлого столетия, их антиопухолевые свойства интенсивно исследуются относительно недавно. Эти полисахариды обладают выраженным противоопухолевым действием, проявляя антипролиферативные, антиметастатичес-

кие, проапоптотические и антиангиогенные свойства (Cawamoto et al., 2006; Cumashi et al., 2007; Boo et al., 2011; Okamoto et al., 2012).

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ СПС

Достижения генетики и молекулярной биологии последних десятилетий оказали огромное влияние на понимание природы инициализации и прогрессии злокачественных образований. Доказательство связи процессов онкогенной трансформации клетки с нарушениями механизмов пролиферации и апоптоза открыло принципиально новые возможности их фармакологической коррекции на уровне мембран, цитоплазмы и ядра, включая модуляцию сигнальных каскадов как на белковом, так и транскрипционном уровне.

Антипролиферативная активность фукоиданов, направленная на подавление синтеза предшественников и репликации ДНК, исследовалась многими авторами начиная с 90-х годов XX века (Elloual et al., 1994; Choosawad et al., 2005; Jiang et al., 2010) и продолжает исследоваться сегодня.

Установлено, что фукоидан, выделенный из водоросли *Fucus vesiculosus* подавляет пролиферацию клеток карциномы толстой кишки линии НСТ-15 (Hyun et al., 2009), клеток лимфомы человека линии HS-Sultan (Aisa et al., 2005), клеток

аденокарциномы желудка человека (Park et al., 2011); α -фукан из *Fucus vesiculosus* снижает содержание белка в среде с миелолейкозными клетками линии HL60 (промиелоцитарные клетки лейкоза человека), что косвенно свидетельствует об антипролиферативном действии биополимера (Куэроз и др., 2006).

Фукоидан из водоросли *Cladosiphon okamuranus* ингибирует рост клеток рака желудка, но не оказывает влияния на нормальные клетки слизистой (Jiang et al., 2010).

Показано антипролиферативное действие фукоидана из *Undaria pinnatifida* на клеточной линии Hca-F и лимфоцитах селезенки мышей в концентрациях больше 1000 мкг/мл (Liu et al., 2010). При этом *in vivo* в селезенке мышей, получивших фукоидан, наблюдалось увеличение пролиферативной активности лимфоцитов и фагоцитарной активности макрофагов, а также повышение уровня провоспалительных цитокинов. Авторы обращают внимание на тот факт, что фукоидан действует не только непосредственно на клетки, но и оказывает антиопухолевое действие путем усиления клеточного и гуморального иммунитета и стимуляции продукции цитокинов мононуклеарами. Этот же полисахарид оказывает антипролиферативное действие на клетки A549 карциномы легких человека (Boo et al., 2011).

Исследованиями ряда авторов установлена связь антипролиферативного действия фукоиданов со структурными характеристиками: моносакхаридным составом, типом связи между моносакхаридными остатками, молекулярной массой и содержанием сульфатных групп (Liu et al., 2000; Haroun-Bouhedja et al., 2000; Aisa et al., 2005). Так, например, H.J. Boo et al. (2011) наблюдал усиление антипролиферативного действия фукоидана из *Undaria pinnatifida* на клетки линии немелкоклеточного рака легких человека A549 с уменьшением молекулярной массы от 510 кДа до 490 кДа. В то же время в работе Y.J. Yang et al., (2008) подтверждена связь увеличения степени сульфатирования фукоиданов из *Undaria pinnatifida* с молекулярной массой 5–30 кДа и >30 кДа с усилением антипролиферативного действия. Значение сульфатных групп в проявлении антипролиферативных свойств установлено и при изучении фукоидана из водоросли *Eisenia bicyclis*, являющегося гомогенным L-фуканом с высоким содержанием сульфатов (32,3%) (Usui et al., 1980) и водорастворимых полисахаридов из *Sargassum kjelmannianum*, тормозящих рост клеток саркомы-180 и лейкемии L-1210 (Yamamoto et al., 1982, 1984). Повышение степени сульфатирова-

ния фракции SKCF полисахарида из *Sargassum kjelmannianum* от 17,2% до 50% приводило к увеличению активности по отношению к клеткам лейкемии на 26% (Takahashi et al., 1984).

Фукоидан из водоросли *Ascophyllum nodosum* в экспериментах *in vitro* на клеточной линии NSCLC (немелкоклеточная бронхолегочная карцинома человека) блокировал фазу G₁ клеточного цикла, во время которой в клетке происходит синтез мРНК, белков и других клеточных компонентов (Riou et al., 1996). Противоопухолевое действие этого полисахарида в субтоксических дозах было подтверждено в опытах *in vivo* на мышах. Низкомолекулярный фукоидан из водоросли *Ascophyllum nodosum* проявлял антипролиферативное действие в концентрациях от 10 до 100 мкг/мл не только на злокачественных (клетки аденокарциномы сигмовидной кишки COLO320DM), но и на нормальных клетках, включая фибробласты (фибробласты почки хомячка CCL39) и клетки гладких мышц (Vischer, Buddecke, 1991).

В экспериментах *in vitro* на культуре клеток HeLa убедительно доказан антипролиферативный эффект гетерополисахаридов из водоросли *Dictyopteris delicatula*, дозозависимо подавляющих рост от 60% до 91,8% клеток (Magalhaes et al., 2011). Выраженное антипролиферативное действие на клетки HeLa, PC3, HepG₂ установлено для фракций гетерополисахаридов из водоросли *Sargassum filipendula* содержащих фуканы и уронаны в различных соотношениях (Costa et al., 2011; Park et al., 2011).

Коммерческий фукоидан из *Cladosiphon novae* ингибировал рост клеток рака молочной железы (MCF-7, MDA-MB-231), рака матки (HeLa) и фибросаркомы (HT 1080) (Zhang et al., 2011). Фуканы из других бурых водорослей подавляли неоангиогенез, модулировали иммунные процессы, задерживали клеточный цикл и/или индуцировали апоптоз (Ye et al., 2005; Liu et al., 2010).

В работе Fukahori et al. (2008) на 15 линиях опухолевых клеток человека исследовано антипролиферативное действие фукоидана из водоросли *Okinawa mozuku*. Авторы обращают внимание на избирательность действия фукоидана, подавляющего пролиферацию только 12 линий клеток. Полисахарид не оказывал действия на клетки одной из двух исследуемых линий карциномы яичника. Jiang et al. (2010), исследовав влияние фукозосодержащих СПС – аскофиллана и фукоидана, выделенных из *Ascophyllum nodosum*, на рост клеточных линий MDCK, Vero, PtK(1), CHO, HeLa, и XC, обнаружили мощное цитотоксическое действие на клетки линии Vero и XC, в то время как

другие клеточные линии были относительно устойчивы к действию полисахаридов.

Таким образом, как следует из приведенных материалов, фукоиданы из разных видов водорослей и на разных экспериментальных моделях оказывают выраженное антипролиферативное действие.

ПРОАПОПТОТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СПС

Апоптоз, или запрограммированная асинхронная гибель клетки, представляет собой естественный физиологический процесс, обеспечивающий физиологическое равновесие и генетическую стабильность организма за счет самоуничтожения генетически измененных дефектных клеток, и является основным компонентом эмбриогенеза, морфогенеза и роста тканей, необходимым для поддержания нормального тканевого гомеостаза. К настоящему времени доказана роль ослабления индукции запрограммированной клеточной гибели в канцерогенезе, в связи с чем высокую перспективность приобретают исследования, ориентированные на разработку индукторов апоптоза опухолевых клеток (Ярилин, 2001; Барышников, Степанова, 2002; Владимирская, 2002). Направленная индукция апоптоза опухолевых клеток может быть более эффективным подходом, чем простое ингибирование их пролиферации (Маянский и др., 1997; Ярилин, 2001; Барышников, Шишкин, 2002; Фильченков и др., 2006). Кроме того, апоптотическая элиминация опухолевых клеток вызывает значительно менее выраженную воспалительную реакцию, чем их некротическое устранение (Фильченков и др., 2006).

Индукция апоптоза в опухолевых клетках фукоиданами, осуществляемая посредством дерегуляции генов, участвующих в промотировании или ингибировании апоптотической программы, может являться одним из возможных механизмов противоопухолевой и антиметастатической активности этих соединений (Yamamoto et al., 1982; Mayer, Krotz, 1987; Itoh et al., 1993; Athucorala et al., 2009).

В работе Y. Aisa et al. (2005) показано, что фукоидан оказывает прямое проапоптотическое действие на опухолевые клетки лимфомы человека линии HS-Sultan через ERK проводящие пути и сопровождается активацией каспазы-3. При этом индукция апоптоза не связана с L- и R-селектинами, являющимися рецепторами фукоидана, поскольку клетки HS-Sultan не экспрессируют эти рецепторы.

В работе Kim et al. (2010) представлен механизм проапоптотического действия фукоидана (Sigma), изученный на культурах клеток раковой опухоли толстой кишки человека HT-29 и HCT116 и связанный с активацией каспаз 8, 9, 7 и 3, снижением уровня белков IAP (белки, блокирующие митохондриальный и рецепторный пути апоптоза), повышением проницаемости мембран митохондрий и высвобождением цитохрома C и Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase), снижением уровня Mcl-1 и повышением экспрессии Fas, DR5 и TRAIL (TNF-зависимый лиганд, селективно индуцирующий апоптоз в различных опухолевых клетках).

Фукоидан из *Fucus vesiculosus* в клетках рака кишечника человека подавлял экспрессию регулятора апоптоза Bcl-2 – внутриклеточного белкового фактора, ингибирующего апоптоз во многих клеточных системах, включая лимфогематопозитические и нейрональные клетки, и контролирующего проницаемость митохондриальной мембраны (Hyun et al., 2009). В то же время полисахарид повышал экспрессию белка Вах, способствующего развитию апоптоза. Изменение экспрессии Вах/Bcl-2 приводило к повышению уровня активных форм каспазы-9 и каспазы-3 и разрушению поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP).

Супрессивные проапоптотические эффекты фукоидана усиливались после химического сульфатирования его молекулы (Haroun-Bouhedja et al., 2000; Koyanagi et al., 2003; Teruya et al., 2005; Jin et al., 2010; Cho et al., 2011).

Высокосульфатированный фукоидан из *Cladosiphon okamuranus* индуцировал возрастание активности каспаз-3 и -7 и разрушение PARP-1 (Teruya et al., 2005), участвующего в репарации поврежденной ДНК и ремоделировании хроматина за счет поли-АДФ-рибозилирования гистонов.

Jin et al. (2010) показали способность фукоидана индуцировать апоптоз промиелоидных лейкоэмических клеток HL60 (промиелоцитарные клетки лейкемии человека), NB4 (клетки лейкемии человека) и THP-1 клеток (моноцитарно-макрофагальная линия клеток человека). Проапоптотические эффекты фукоидана были связаны с активацией внеклеточной сигнальной регуляторной киназы (ERK) и киназы p38, а также с инактивацией фосфотидил-инозитол-3-киназного (p13)/Akt сигнального пути, активацией каспаз-3, -8, -9, изменением проницаемости мембран митохондрий, восстановлением глутатиона и образованием NO.

Фукоидан, выделенный из водоросли *Cladosiphon okamuranus*, *in vitro* индуцировал

апоптоз HTLV-1-инфицированных Т-клеточных линий (Haney et al., 2005). Механизм индукции апоптоза был связан с подавлением клеточных ингибиторов апоптоза – протеина-2 и сурвивина, а также с накоплением Т-лимфоцитов в фазе G1 клеточного цикла за счет подавления циклина D-2 (белка, являющегося одним из активаторов циклин-зависимых протеинкиназ (CDK) – ключевых ферментов, участвующих в регуляции клеточного цикла), инактивацией ядерного фактора транскрипции NF- κ B и транскрипционного фактора AP-1 (activator protein-1). В экспериментах *in vivo* фукоидан вызывал частичное ингибирование роста опухолей HTLV-1-инфицированных клеточных линий, трансплантированных подкожно мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом.

Boo et al. (2011) наблюдали апоптотический эффект фукоидана из *Undaria pinnatifida* по отношению к клеткам человеческой карциномы легких A549. Механизм индукции апоптоза в клетках A549 фукоиданом авторы связывают со снижением экспрессии белка Bcl-2, а также подавлением экспрессии фосфо-p38/P13K/AT, ослабляющих активацию ERK1/2/MAPK путей сигнальной трансдукции.

Фукоидан из *Fucus vesiculosus* эффективно подавлял рост клеток культуры AGS – аденокарциномы желудка человека (Park et al., 2011). Полисахарид индуцировал аутофагию, маркируемую по превращению белка легкой цепи (LC3)-1, ассоциированного с микротрубочками в LC3-II, и аккумуляции белка Beclin-1, и апоптоз, который сопровождался ингибированием экспрессии протоонкогенов Bcl-2 и Bcl-xL, потерей потенциала мембран митохондрий, активацией каспаз и деградацией PARP.

Описан эффект фракции фукоидана (полидисперсный 1,3;1,4- α -L-фукан (Mw=47-420 kDa), содержащий 13,5% полифенолов и 18,5% белков) из *Ascophyllum nodosum* в конечной концентрации 1 мг/мл на апоптоз клеток рака кишечника человека (HCT 116) через активацию каспаз-9 и -3 (Foley et al., 2011).

В раковых клетках молочной железы линии MCF-7 фукоидан из *S. okamuranus* вызывал апоптотическую гибель клеток по каспазо-8-зависимому пути, не оказывая влияния на нормальные клетки. Эффект был дозозависимым (Yamasaki-Miyamoto et al., 2009).

Коммерческий фукоидан из *Cladosiphon novae-caledoniae* индуцировал транслокацию цитохром C и активацию MAP киназ (JNK, p38 и ERK1/2). При этом не наблюдалось расщепления каспаз 7,

8 и 9 (MCF-7 клетки экспрессируют каспазу-3) и активации PARP и Bid (Zhang et al., 2011).

В качестве индукторов апоптоза запатентованы противоопухолевые канцеростатические средства, активным компонентом которых являются фукозосодержащие СПС или продукты их деградации (Sakai et al., 2001).

Способность фукоиданов из *Fucus vesiculosus* (Moon, 2009a) и *Costaria costata* (Moon, 2009b) ингибировать фосфорилирование ERK, JNK и p-38, экспрессию матричной РНК и белка MMP-1 в клетках кератиноцитов человека (HaCaT) и фибробластов кожи человека (HS68) определяет новое направление использования полисахаридов в качестве агентов, защищающих кожу от ультрафиолетового облучения.

Нами показан проапоптотический эффект фукоидана, выделенного из бурой водоросли *Fucus evanescens* в отношении клеток перевиваемых линий Н9 (Т-клеточная лейкемия человека), HL-60 (миелобластный лейкоз), K562 (эритробластный лейкоз) (Запорожец, Беседнова, 2007).

Способность фукоиданов из *Fucus evanescens* и *Laminaria cichorioides* модулировать апоптоз клеток лейкоза человека MT-4 и Namalwa, индуцированный ингибитором ДНК – топоизомеразы-II этопозидом исследована в работе А.А Фильченкова и др. (2006). Используемые в исследовании полисахариды (Ф1, Ф2, Ф3) значительно различались по моносакхаридному составу, типу связи между моносакхаридными остатками и содержанию сульфатов. Препарат Ф1 представлял собой суммарную фракцию полисахаридов (содержание сульфатов – 13,9%), выделенную из *Fucus evanescens*, гетерогенную по моносакхаридному составу и содержащую помимо фукоидана около 30% полиманнуроновой кислоты, для которой показаны иммуномодулирующая и противоопухолевая активности (Zvyagintseva et al., 2005). Остатки фукозы в фукоидане связаны чередующимися α -1,3 и α -1,4-гликозидными связями. Препарат Ф2 был выделен из Ф1 ионообменной хроматографией и являлся практически чистым 1,3;1,4- α -L-фуканом, сульфатированным, в основном, по С₂ остатков фукозы и частично ацетилированным по свободным положениям. Содержание сульфатов составило 28,5%. Препарат Ф3, выделенный из бурой водоросли *Laminaria cichorioides*, характеризовался как высокосульфатированный 1,3- α -L-фукан (содержание сульфатов – 28%) с примесью ламинарана (20%) (Zvyagintseva et al., 2003). Обработка клеток MT-4 или Namalwa фукоиданами в концентрациях 5–500 мкг/мл не приводила к существенному торможению их роста

и не сопровождалась массовой гибелью клеток. При инкубации с фукоиданами на протяжении двух суток распределение клеток МТ-4 по фазам цикла практически не отличалось от такового в контроле. Эти результаты не согласуются с данными, полученными Riou et al. (1996) и Haneji et al. (2005), которые наблюдали остановку в G1-фазе клеточного цикла при действии фукоидана *in vitro*. Такое расхождение может быть объяснено различием в используемых препаратах фукоидана, либо особенностями клеточной модели.

При индукции этопозидом апоптоза в клетках МТ-4 или Namalwa, предкультивированных с фукоиданами, в течение суток и на протяжении нескольких пассажей (до 14 суток) обнаруживались признаки этопозид-индуцированного апоптоза, наиболее выраженные для препарата ФЗ (высокосульфатированный 1,3- α -L-фукоан из *L. cichorioides*).

Усиление индукции апоптоза под действием всех исследованных фукоиданов не сопровождалось дополнительной активацией каспазы-3, что свидетельствует как о предельном уровне активации этого фермента, необходимом для развития апоптоза в данной системе, так, возможно, и о подключении других каспазо-независимых путей реализации апоптоза.

Исследованные фукоиданы отличались друг от друга типом гликозидных связей, моносакхаридным составом, степенью сульфатирования, молекулярными массами и обладали проапоптотической активностью. Авторы приходят к заключению, что для проявления данной биологической активности тип связи не важен, либо необходимо присутствие только α -1,3-связанной фукозы, степень же сульфатирования может быть достаточной даже в случае использования самого низкосульфатированного препарата.

Одним из интегративных факторов, объединяющих все апоптотические сигналы, является оксидативный стресс (Утешев, Сергеев, 1998; Bait et al., 2002). Внутриклеточная продукция активных форм кислорода (АФК) имеет фундаментальное значение как в индукции пролиферации, так и в развитии апоптоза. Анализ имеющихся в литературе материалов достаточно определенно указывает на предапоптотические нарушения в митохондриях, связанные с избыточным образованием O_2 и продуктов его последующих превращений (Stoian et al., 1996). С этим сдвигом связывается факт образования пор во внутренней мембране митохондрий, рассматриваемый как необходимый этап, ведущий к появлению апоптоза (Zoratti, Szabo, 1995). TNF α и Fas-индуцированный апо-

птоз, в известной степени, также обусловлен способностью вызывать в клетке образование реактивных форм кислорода (Takeda et al., 2002). Апоптотическая смерть клетки может быть индуцирована и адгезивным сигналом. Так, Giblin et al. (1997) показали, что сшивание фукоиданом L-селектина – внутриклеточного домена, связанного с апоптоз-индуцирующей молекулой Fas (Ishiwatari-Nayasaka et al., 1997), индуцирует апоптоз в рецептор-экспрессирующих клетках. Ранее мы показали, что фукоидан из *Fucus evanescens* индуцирует продукцию активных форм кислорода нейтрофилами, синтез TNF α и IL-1 мононуклеарами, а также обладает выраженной митогенной активностью и способностью усиливать экспрессию рецепторов адгезии (Запорожец, 2006). Учитывая полученные нами данные и литературные материалы, можно полагать, что оксидативный стресс, индукция цитокинов, митогенный и адгезивный сигналы могут быть решающими в обеспечении проапоптотических свойств СПС из морских водорослей. Подобная трактовка в отношении оксидативного стресса, модулирующего TNF и Fas – опосредованный апоптоз *in vivo*, приведена в работе Takeda et al. (2002).

АНТИМЕТАСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СПС МОРСКИХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Инвазия и метастазирование являются главными проявлениями злокачественных новообразований и основными причинами гибели больных раком. Процесс метастазирования зависит от свойств первичной опухоли, клеточный состав которой неоднороден по генетическим и фенотипическим признакам, и от реактивности организма – носителя опухоли. Способность злокачественной опухоли к метастазированию основана на инфильтрирующем росте с инвазией в лимфатические и кровеносные сосуды, слабой связи между опухолевыми клетками, а также на благоприятной биохимической ситуации в тканях для приживания ракового эмбола. Опухолевая экспансия сопровождается разрушением тканей, окружающих злокачественную опухоль, и созданием сети сосудов.

В связи с этим весьма актуален поиск веществ, способных эффективно воздействовать на различные компоненты процесса метастазирования. В настоящее время интенсивно и достаточно результативно исследуются в этом плане СПС из морских водорослей.

В работе (Coombe et al., 1987) приведены данные о подавлении фукоиданом легочных метаста-

зов после внутривенных инъекций клеток аденокарциномы 13762МАТ молочной железы крыс. Многократное введение фукоидана ингибировало фиксацию метастатических клеток саркомы L-1 в легких мышей BALB/c (Roszkowsky et al., 1989). Фукоиданы, выделенные из *Laminaria saccharina*, *Laminaria digitata*, *Fucus serratus*, *Fucus distichus* и *Fucus vesiculosus* подавляли адгезию клеток карциномы молочной железы MDA-MB-231 к тромбоцитам (Cumashi et al., 2007).

В наших исследованиях (Вишук и др., 2009) был проведен анализ противоопухолевой и антиметастатической активности фукоиданов, выделенных из 9 видов бурых водорослей (*Fucus evanescens*, *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida*, *Laminaria cichorioides* (Охотское море), *Sargassum swartzii*, *Sargassum mcClurei*, *Sargassum denticarpum*, *Sargassum spp.*, *Sargassum polycystum* (Южно-Китайское море) и имеющих различную структуру. Фукоиданы, выделенные из бурых водорослей Дальневосточных морей, являются высокосульфатированными полисахаридами, тогда как фукоиданы из бурых водорослей Южно-Китайского моря — низкосульфатированными (содержание сульфатных групп менее 12%), за исключением фукоидана из *Sargassum polycystum*. Все исследованные фукоиданы были нетоксичны по отношению к клеткам рака кишечника человека DLD-1 и HT-29 в концентрации до 200 мкг/мл. При обработке клеток фукоиданы (50 мкг/мл) в различной степени тормозили рост колоний клеток DLD-1 и HT-29. Наиболее выраженное противоопухолевое действие проявили фукоиданы из *Laminaria cichorioides* и *Laminaria japonica*. Фукоиданы из *Sargassum swartzii*, *Sargassum denticarpum* и *Sargassum mcClurei* практически не обладали противоопухолевой активностью, что, вероятно, связано со строением главной цепи молекулы. Об этом говорит тот факт, что фукоидан из *Laminaria cichorioides*, проявивший наибольшую активность, содержал главную цепь, построенную только из α -1,3-связанной фукозы. Фукоиданы из *Fucus evanescens* и *Undaria pinnatifida*, активность которых была выражена в меньшей степени, построены из 1,3-1,4-связанных остатков α -L-фукопиранозы и галактозы.

Показано также, что фукоиданы из *Laminaria guryanovae* (Lee et al., 2008b) и *Laminaria cichorioides* (Lee et al., 2008a) подавляли неопластическую трансформацию нормальных мышечных эпидермальных клеток JB6 C141, вызываемую действием эпидермального фактора роста (EGF) — относящегося к числу рецепторных тирозинкиназ — важных регуляторов клеточной пролиферации и злокачественной трансформа-

ции, или 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата (ТРА). Механизм противоопухолевого действия фукоидана связан с его способностью взаимодействовать непосредственно с EGF и тем самым препятствовать связыванию EGF с его рецептором на поверхности эпителиальных клеток. Ингибирование фосфорилирования рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) приводит к подавлению фосфорилирования внеклеточных сигналов регулируемых киназ ERK и активности генов раннего реагирования *c-fos*, *c-jun*, участвующих в активации клеточной пролиферации или дифференцировки.

Возможные механизмы противоопухолевого и антиметастатического действия фукоиданов могут быть связаны с их способностью ингибировать адгезию клеток к экстрацеллюлярному матриксу. Показано, например, что фукоиданы из *Ascophyllum nodosum* (Liu et al., 2000) и *Spatoglossum schroederi* (Rocha et al., 2005) уже через 10 минут контакта высокоаффинно связываются с фибронектином — белком зрелой соединительной ткани с выраженными адгезивными свойствами, способствующим адгезии и распространению эпителиальных и мезенхимальных клеток, стимулирующим пролиферацию и миграцию эмбриональных и опухолевых клеток. Антиметастатический эффект фукоидана был обусловлен ингибированием гепарин-связывающего и клеточно-связывающего доменов белка, реорганизацией альфа 5 субъединицы интегрин, а также подавлением экспрессии винкулина (Liu et al., 2000; Rocha et al., 2005). Способность фукоидана связываться с фибронектином зависела от присутствия сульфатных групп в молекуле полисахарида: десульфатированный фукоидан утрачивал способность ингибировать адгезию клеток (Rocha et al., 2005).

На модели перевиваемой аденокарциномы легких Льюис мышей было показано, что фукоидан из *Fucus evanescens* оказывал самостоятельное умеренное антиметастатическое действие, а также потенцировал антиметастатическую, но не противоопухолевую активность циклофосфана (Жанаева и др., 2009). Для изучения одного из возможных механизмов противоопухолевого действия фукоидана в тканях аденокарциномы легких Льюис у мышей исследовали изменение активности цистеиновых протеаз липосом катепсинов В и L и аспартильной протеазы катепсина D. Известно, что протеазы лизосом наряду с другими протеазами клеток (сериновые протеазы, активаторы и ингибиторы плазминогена, матриксные металлопротеиназы) играют важную роль в регуляции опухолевого роста, а также участвуют в реализации апоптотической или некротической

гибели опухолевых клеток (Короленко и др., 2010; Потеряева и др., 2004). Было установлено, что 3-х кратное применение фукоидана (5 и 10 мг/кг) самостоятельно или в сочетании с циклофосфаном приводило к снижению активности катепсина L в ткани аденокарциномы легких Льюис. В то же время, активность катепсина D была повышена у мышей, леченных циклофосфаном или циклофосфаном в сочетании с фукоиданом (10 мг/кг×3). По мнению авторов, увеличение активности катепсина D в данном случае, вероятно, индуцировано циклофосфаном и вопрос о том, связаны ли наблюдаемые отдаленные (через 10 суток после применения препарата) изменения активности протеаз в ткани аденокарциномы легких Льюис с противоопухолевым эффектом фукоидана – остается открытым и требует дальнейшего изучения.

АНТИАНГИОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ СПС

Опухолевый рост и метастазирование сопровождаются развитием неконтролируемого ангиогенеза, характеризующегося усиленной экспрессией основного фибробластного ростового фактора (bFGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), повышением активности матрикс-металлопротеиназ (Aguayo et al., 2000; Li et al., 2001; Li et al., 2001; Kumar et al., 2004). Антиангиогенная терапия может быть как прямой, направленной на здоровые, генетически стабильные клетки сосудов опухоли (антагонисты VEGF-рецептора, антитела к VEGF-рецептору, нейтрализующие антитела и молекулы-антагонисты к рецепторам интегринов и молекулам адгезии, специфически экспрессируемых на вновь образованных эндотелиальных клетках), так и не прямой – снижающей образование или нейтрализующей стимуляторы неоангиогенеза, в первую очередь фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) и матрикс-металлопротеиназы.

Угнетение ангиогенеза является одним из важных механизмов противоопухолевого действия фукоиданов.

Narazaki et al. (2008) установили, что фукоидан снижает VEGF₁₆₅-индуцированный ангиогенез и неоваскуляризацию опухоли у мышей. Механизм действия полисахаридов связан с уменьшением на поверхности эндотелиальных клеток экспрессии VEGFR-1 и VEGFR-2, нейрофилинов (NRP1) и (NRP2), через которые VEGF осуществляет свои эффекты, а также с блокадой связывания семафоринов класса 3 и VEGFR-1. Авторы полагают, что фукоидан, связываясь с внеклеточным доменом NRP1 и сквенджер-рецептором (SREC-I),

индуцирует интернализацию NRP1 и SREC-I в лизосомы. Эти результаты демонстрируют, что интернализация рецепторов является эффективной стратегией для снижения их уровня и функции на клеточной поверхности, а также позволяет рассматривать сульфатированные полисахариды в качестве “индукторов интернализации”.

В работе (Koyanagi et al., 2003) показано подавление природным и гиперсульфатированным фукоиданом неоваскуляризации, индуцированной клетками Sarcoma 180, саркомы легких Льюис и меланомы B16 у мышей, сопряженную с ингибированием митогенной и хемотаксической активности VEGF.

Ye et al. (2005) установили способность фукоидана из *Cladosiphon novae-caledoniae* *in vitro* блокировать ангиогенез клеток карциномы HeLa, подавляя экспрессию и секрецию эндотелиального фактора роста сосудов VEGF. По мнению авторов, ингибирование инвазии опухолевых клеток и ангиогенеза обусловлено, по крайней мере частично, антиоксидантным потенциалом фукоидана – активацией антиоксидативных ферментов – супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. Угнетение инвазивной способности клеток фибросаркомы HT-1080 человека фукоиданом авторы также связывают с ингибированием матрикс-металлопротеиназ.

О возможности ингибирования матрикс-металлопротеиназ фукоиданом сообщается в работах (Senni et al., 2006; Moon et al., 2009; Hlawaty et al., 2011).

S. Soeda et al. (2000) показали также, что гиперсульфатированный фукоидан значительно подавляет индуцированную фактором роста фибробластов FGF миграцию человеческих эндотелиоцитов, увеличивает продукцию ингибитора активатора плазминогена-1, что может играть ключевую роль для предотвращения миграции клеток сосудов.

Фукоидан из бурой водоросли *Turbinaria conoides* подавлял ангиогенез в клетках хориона аллантоисной мембраны развивающихся куриных эмбрионов, в которые вводили клетки карциномы толстой кишки COLO 320DM (Delma et al., 2008). Этот же полисахарид подавлял миграцию опухолевых клеток.

Значительную роль в ангиогенезе играет циклооксигеназа ЦОГ-2, проангиогенный эффект которой обусловлен, по крайней мере, тремя продуктами метаболизма – тромбоксаном A(2), простагландинами E2 и I2 (Gately, Li, 2004). Замечено, что снижение рецидивирования опухолей

наблюдается при приеме ингибиторов ЦОГ-2 (например нестероидных противовоспалительных препаратов). Недавно выявленный ингибирующий эффект фукоидана на экспрессию ЦОГ-2 (Park et al., 2011) может являться одним из механизмов антиангиогенного действия фукоиданов.

ДЕЙСТВИЕ СПС НА ИММУННУЮ СИСТЕМУ ПРИ РАЗВИТИИ ОПУХОЛЕЙ

Среди отличительных характеристик злокачественных опухолей (наряду с самообеспечением клеток внутренними сигналами роста, игнорированием рост-ингибирующих сигналов, избеганием клеточной гибели, безудержной репликацией, поддержанием ангиогенеза (Hanahan, Weinberg, 2000)), большое значение имеет способность опухолевых клеток уклоняться от иммунного надзора (Dunn et al., 2002, 2004). Противоопухолевый иммунитет реализуется с участием Th1-зависимого и, в меньшей степени, Th2-зависимого иммунного ответа (Dunn et al., 2002, 2004; Hanahan, Weinberg, 2000; Zitvogel et al., 2006; Kim et al., 2007), а также факторов врожденного иммунитета, повреждающих опухолевые клетки (NK-клеток, моноцитов/макрофагов, α и β интерферонов, ЛАК-клеток).

Существование многочисленных способов супрессии иммунной системы опухолевыми клетками с одновременным ускользанием от ее надзора привело к появлению многочисленных методов иммунотерапии рака. Моноклональные антитела первого и второго поколений, иммуномодуляторы, различные цитокины, иммунные адъюванты, профилактические и терапевтические вакцины, супрессоры иммунных клеток, адоптивная Т-клеточная терапия, трансплантация клеток костного мозга (Dougan, Dranoff, 2009), нанотехнологии – вот лишь краткий перечень направлений в иммунотерапии рака. В этом ряду определенное место занимают СПС из водорослей, влияние которых на иммунную систему доказано в экспериментах при разных видах злокачественного роста.

Показано, например, что фукоиданы из водорослей *Sargassum spp.* и *Fucus evanescens* значительно повышают цитолитическую активность NK-клеток мышей линии C57Bl/6JCL, которым в течение 4-х дней до введения клеток меланомы B6 или карциномы легких, вводили фукоидан в дозе 50 мг/кг (Ale et al., 2011; Kitasato, 2006).

Данные по влиянию фукоидана из *Undaria Pinnatifida* на функциональную активность клеток врожденного и адаптивного иммунитета представлены в работах Н. Maquyama et al. (2003, 2006), показавших увеличение количества и уси-

ление цитолитического действия NK клеток по отношению к клеткам-мишеням YAC (Maquyama et al., 2006), повышение уровня IFN γ , продуцируемого Т-лимфоцитами (Maquyama et al., 2003).

Увеличение количества NK-клеток в селезенке мышей с опухолью кишечника, получавших перорально фукоидан из *Cladosiphon okamuranus*, наблюдали K. Azuma et al. (2012).

В последнее время внимание исследователей сосредоточено на неоднородности циркулирующих моноцитов и тканевых макрофагов. Выделяют не менее 2-х фенотипически различающихся субпопуляций макрофагов: CD14^{hi}CD16 (M1) и CD14^{low}CD16 (M2), обладающих воспалительными, либо противовоспалительными свойствами (Gordon, Taylor, 2005; Mills et al., 2000; Mosser, 2003). При бластомогенезе макрофаги приобретают фенотип M2: не проявляют противоопухолевой активности, не вырабатывают токсических медиаторов, усиливают ангиогенез, способствуют опухолевой прогрессии и метастазированию (Mantovani, 2006). Преобладание статуса M2 у макрофагов при злокачественных новообразованиях коррелирует с супрессией противоопухолевых Т- и NK клеток и является неблагоприятным прогностическим признаком (Budhu et al., 2006).

Показано, что противоопухолевый эффект фукоиданов во многом обусловлен их способностью активировать макрофаги (Patankar et al., 1993; Wang et al., 2010), и, в частности, поляризовать дифференцировку моноцитов в макрофаги фенотипа M1 (с выраженными противоопухолевыми свойствами), поддерживать Th1 тип иммунного ответа, повышать продукцию IL-12 и снижать IL-10 (Shepetkin, 2006).

Установлено также (Takeda et al., 2012), что макрофаги мышей линии RAW264.7, обработанные фукоиданом, полученным из бурой водоросли *Cladosiphon okamuranus*, проявляли цитотоксическое действие по отношению к клеткам саркомы S-180, сопряженное с повышенной продукцией оксида азота стимулированными макрофагами через NF-kB-зависимый сигнальный путь.

В настоящее время с целью возможного применения в терапии рака в качестве адъювантов вакцин и антиген-независимых стимуляторов иммунитета интенсивно изучаются Toll-like рецепторы и их агонисты (Tse, Horner, 2007). Ряд агонистов TLR находятся на стадиях предклинического и клинического изучения (Kanzler et al., 2007; Krieg, 2007). Доказано также, что СПС являются агонистами Toll-like рецепторов (Макаренкова, 2012). Однако, как оказалось, вопрос не так однозначен, как представлялось сначала. С одной стороны

показано, что TLR и их лиганды могут выступать в роли супрессоров опухолевого роста, с другой стороны – могут стимулировать опухолевый рост и влиять на устойчивость опухолей к химиотерапии. В связи с этим предстоит серьезное изучение их роли при злокачественном росте с целью предотвращения их негативных эффектов на развитие различных опухолей.

Таким образом, представленные данные убедительно демонстрируют антипролиферативные, проапоптотические, антиметастатические, антиангиогенные, иммуномодулирующие свойства сульфатированных полисахаридов из водорослей. Исследование новых функциональных свойств и механизмов действия сульфатированных полисахаридов открывают широкие перспективы использования этих биополимеров в сфере биомедицинских технологий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Барышников А.Ю., Степанова Е.В. Проблемы лекарственной резистентности // Материалы VIII ежегодной российской онкологической конференции. СПб. 1999. С. 38.
- Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Медицина, 2002. 318 с.
- Вищук О.С., Ермакова С.П., Фам Дюк Тин, Звягинцева Т.Н. Противоопухолевая активность фукоиданов бурых водорослей // Тихоокеанский мед. журн. 2009. № 3. С. 92–95.
- Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия // Клин. лаб. диагн. 2002. № 11. С. 25–32.
- Жанаева С.Я., Алексеенко Т.В., Короленко Т.А., Звягинцева Т.Н. Противоопухолевая и антиметастатическая активность сульфатированного полисахарида фукоидана бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens* // Тихоокеанский мед. журн. 2009. № 3. С. 96–99.
- Запорожец Т.С. Клеточные и молекулярные механизмы иммуномодулирующего действия биополимеров морских гидробионтов. Дисс.... докт. мед наук. Владивосток. Защита во Владивостокском государственном медицинском университете. 2006. 365 с.
- Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Иммуноактивные биополимеры из морских гидробионтов. Владивосток: Изд-во ТИПРО-центра, 2007. 219 с.
- Короленко Т.А., Жанаева С.Я., Филатова Т.Г., Беличенко В.М., Алексеенко Т.В. . Регуляция активности цистеиновых протеаз: роль предшественников протеаз (проферментов) и внутриклеточных ингибиторов // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2010. № 8. С. 198–201.
- Куэрзос К., Ассис К., Медейрос В., Роша Х., Аояма Х., Ферейра К., Лете Е. Цитотоксический эффект полисахаридов, выделенных из водорослей, на HL60 клетки // Биохимия. 2006. Т. 71. № 12. С. 1613–1617.
- Макаренкова И.Д., Логунов Д.Ю., Тухватулин А.И., Семенова И.Б., Звягинцева Т.Н., Горбач В.И., Ермакова С.П., Беседнова Н.Н. Сульфатированные полисахариды бурых водорослей – лиганды Толл-подобных рецепторов // Биомед. химия. 2012. Т. 58. С. 318–325.
- Маянский А.Н., Маянский Н.А., Абаджиди М.А. Апоптоз: начало будущего // Журн. микробиол. 1997. № 2. С. 88–94.
- Потеряева О.Н., Короленко Т.А., Поспелова Т.И., Халикова Т.А. Цистеиновые протеазы катепсины В и L и их ингибитор цистатин С у больных гемобластомами // Гематология и трансфузиология. 2004. № 4. С. 18–22.
- Усов А.И., Билан М.И. Фукоиданы – сульфатированные полисахариды бурых водорослей // Успехи химии. 2009. Вып. 78, № 8. С. 846–861.
- Утешев Д.Б., Сергеев А.В. Апоптоз. Фармакологические аспекты // Эксп. клин. фармакол. 1998. Т.60. № 4. С. 57–65.
- Фильченков А.А., Завельевич М.П., Храновская Н.Н., Запорожец Т.С., Имбс Т.И., Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н. Изучение способности фукоиданов из дальневосточных бурых водорослей модулировать апоптоз клеток МТ-4 лейкоза человека *in vitro* // Российский биотерапевт. Журн. 2006. Т. 5. № 4. С. 30–37.
- Хотимченко Ю.С. Противоопухолевые свойства некрахмальных полисахаридов: фукоиданы, хитозаны // Биология моря. 2010. Т.36. № 5. С. 319–328.
- Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии. М.: Медицина, 2001. С. 13–56.
- Adhami V.M., Malik A., Zaman N., Sarfaraz S., Siddiqui I.A., Afag F., Pasha F.S., Saleem M., Mukhtar H. Combined inhibitory effects of green tea polyphenols and selective cyclooxygenase-2 inhibitors on the growth of human prostate cancer both *in vitro* and *in vivo* // Clin Cancer Res. 2007. V.13. № 5. 1611–1619.
- Aguayo A., Kantarjian H., Manshouri T., Gidel S., Estey E., Thomas D., Koller C., Estrov C., O'Brien S., Keating M., Freireich E., Albitar M. Angiogenesis in acute and chronic leucemias and myelodysplastic syndromes // Blood. 2000. V. 96. P. 2240–2245.
- Aisa Y., Miyakawa Y., Nakazato T., Shibata H., Saito K., Ikeda Y., Kizaki M. Fucoidan induces apoptosis of human HS-sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways // Am. J. Hematol. 2005. V. 78. P. 7–14.
- Ale M.T., Maruyama H., Tamauchi H., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. Fucoidan from *Sargassum* spp. 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. 2011. V. 49. P. 331–336.
- Athucoral G.G., Ahn G.N., Jee Y.H., Kim G.Y., Kim S.H., Ha J.H., Kang J.S., Lee K.W., Jeon Y.J. Antiproliferative activity of sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of *Eclonia cava* on the U-937 cell line // J. Appl. Phycol. 2009. V. 21. № 3. P. 307–314.
- Azuma K., Ishihara T., Nakamoto H., Amaha T., Osaki T., Tsuka T., Imagawa T., Minami S., Takashima O., Ifuku S., Morimoto M., Saimoto H., Kawamoto H., Okamoto Y. Effects of Oral Administration of Fucoidan Extracted from *Cladosiphon okamuranus* on Tumor Growth and Survival Time in a Tumor-Bearing Mouse Model // Marine Drugs. 2012. V. 10. P. 2337–2348.
- Bait M.L., Ho Y.S., Vonderfecht S.L., Jaeschke H. Reactive oxygen as modulator of TNF and fas receptor-mediated apoptosis *in vivo*: studies with glutathione peroxidase-deficient mice // Antioxid. Redox. Signal. 2002. V. 4. № 5. P. 733–740.
- Boo H.J., Hyun J.H., Kim S.C., Kang J.I., Kim M.K., Kim S.Y., Cho H., Yoo E.S., Kang H.K. Fucoidan from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in A549 human lung carcinoma cells // Phytotherapy Research. 2011. V. 25. № 7. P. 1082–1086.
- Boopathy N.S., Kathiresan K. Anticancer drugs from marine Flora: review // J. of Oncology. 2010. V. 155. № 18. P. 86–214.
- Brunner G., Reimbold K., Meissauer A., Schirrmacher V., Erkel I. Sulfated glycosaminoglycans enhance tumor cell invasion *in vitro* by stimulating plasminogen activation // Exp. Cell Res. 1998. V. 239. P. 301–310.
- Budhu A., Forgues M., Ye Q.H., Jia L.H., He P., Zanetti K.A., Kammula U.S., Chen Y., Quin L.X., Tang Z.Y., Wang X.W. Prediction of venous metastases, recurrence and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment // Cancer Cell. 2006. V. 10. P. 99–111.
- Cho M.L., Lee B.Y., Sang G.Y. Relationship between oversulfation and conformation of low and high molecular weight fucoidans and evaluation of their *in vitro* anticancer activity // Molecules. 2011. V. 16. № 1. P. 291–297.
- Choosawad D., Leggat U., Dechsukhum C., Fongdara A., Chotigeat W. Anti-tumor activities of fucoidan from the aquatic plant *Utricularia aurea* Lour // J. Sci. Technol. 2005. V. 27. № 3. P. 799–807.
- Collen P.N., Lemoine M., Daniellou R. Enzymatic degradation of k-carrageenan in aqueous solution // Bio-macromolecules. 2009. V. 10. P. 1757–1767.
- Coombe D.R., Parish C.R., Ramshaw I.A., Snowden J.M. Analysis of the inhibition of tumour metastasis by sulfated polysaccharides // Int. J. Cancer. 1987. V. 39. P. 82–88.
- Costa L.S., Telles C.B.S., Oliveira R.M., Nobre L.T.D.B., Dantas-Santos N., Camara R.B.G., Costa M.S.S.P., Almeida-Lima J., Silveira R.F.M., Albuquerque I.R.L., Rocha H.A.O. Heterofucan from *Sargassum filipendula* induces apoptosis in HeLa cells // Mar. Drugs. 2011. V. 9. № 4. P. 603–614.
- Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., D'Incecco A., Piccoli A., Totani L., Tinari N., Morozovich G.E., Berman A.E., Bilan M.I., Usov A.I., Ustyuzhanina N.E., Frachev A.A., Sanderson C.J., Kelly M., Rabinovich G.A., Iacobelli S., Nifantiev N.E. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds // Glycobiology. 2007. V. 17. P. 541–552.
- D'Ayala G.G., Malinconico M., Laurienzo P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches // Molecules. 2008. V. 13. P. 2069.
- Delma C., Ramalingam K., Pandian V., Baskar A., Sivarimuthu B., Somasundaram S. Angiogenesis and Invasion: abstract A4; Antagonistic effects of sulfated polysaccharides from *Turbinaria conoides* on tumor cell migration and angiogenesis // Cancer Prevention Res. 2008. V. 1. P. 56–63.
- Dougan M., Dranoff G. Immune therapy for cancer // Annu. Rev. Immunol. 2009. V. 27. P. 83–117.
- Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape // Nat. Immunol. 2002. V. 3. P. 991–998.
- Dunn G.P., Lloid O.J., Schreiber R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting // Immunity. 2004. V. 21. P. 137–148.
- Elloual M., Boisson-Vidal C., Jozefonvic J. Antiproliferative effect and interaction of fucans with cells // Biointerface. 1994. V. 2. P. 305–314.
- Foley S.A., Mulloy B., Tuohi M.G. An unfractionated fucoidan from *A. nodosum*: extraction, characterization and apoptotic effects *in vitro* // J. Nat. Prod. 2011. V. 74. P. 1851–1861.
- Fucahori S., Yano H. Fucoidan, a major component of brown seaweed, prohibits the growth of human cancer cell lines *in vitro* // Molecular Medicine. 2008. V. 1. № 4. P. 537–542.
- Galon J., Costes A., Sanchez-Cabo F., Kirilovsky A., Mlecnik B., Lagorce-Pages C., Tosolini M., Camus M., Berger A., Wind P., Zinzindohoue F., Bruneval P., Cugnenc P.H., Trzjanoski Z., Fridman W.H., Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome // Science. 2006. V. 313. P. 1960–1964.
- Gately S., Li W.W. Type, density and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome // Semin Oncol. 2004. V. 31. № 7. P. 2–11.
- Giblin P.A., Hwang S.T., Katsumoto T.R., Rosen S.D. Ligation of L-selectin on T-lymphocytes activates beta-1-integrins and promotes adhesion to fibronectin // J. Immunol. 1997. V. 159. № 7. P. 3498–3507.

- Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity // *Nat. Rev. Immunol.* 2005. V. 5. P. 953–964.
- Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // *Cell.* 2000. V. 100. P. 57–70.
- Haneyi K., Matsuda T., Tomita M. et al. Fucoidan extracted from *Cladosiphon okamuranus Tokida* induces apoptosis of human T-cell leukemia virus type1-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells // *Nutr. Cancer.* 2005. V. 52. P. 189–201.
- Haroun-Bouhedja F., Ellouali M., Siquin C., Boisson-Vidal C. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans // *Thromb. Res.* 2000. V. 100. P. 453–459.
- Hlawaty H., Suffce N., Sutton A., Oudar O., Haddad O., Oliver V., Laquillier-Morizot C., Gattegno L., Letourneur D., Charnaux W. Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2-expression // *Biochemical Pharmacology.* 2011. V. 81. P. 233–243.
- Huamao Y., Song J., Li X., Li N. Enhanced immunostimulatory and antitumor activity of different derivatives of k-carrageenan oligosaccharides from kappa phycus striatum // *J. of Applied Phycology.* 2011. V. 23. № 1. P. 59–65.
- Hyun J.H., Kim S.C., Kang J.I., Kim M.K., Boo H.J., Kwon J.M., Koh Y.S., Hyun J.W., Park D.B., Yoo E.S. Apoptosis inducing activity of fucoidan in NCT-15 colon carcinoma cells // *Biol. Pharm. Bull.* 2009. V. 32. P. 1760–1764.
- Ikeguchi V., Yamamoto M., Arai Y., Maeta Y., Ashida K., Katano K., Miki Y., Kimura T. Fucoidan reduces the toxicities of chemotherapy for patients with unresectable advanced or recurrent colorectal cancer // *Oncology Letter.* 2011. V. 2. № 2. P. 319–322.
- Ishiwatari-Hayasaka K., Kawashima H., Osawa T., Nagata S., Miyasaka M. Apoptosis inducing activity of fucoidan in NCT-15 colon carcinoma cells // *Int. Immunol.* 1997. V. 9. № 4. P. 627–635.
- Itoh H., Noda H., Amano H., Zhuang C., Mizuno T., Itoh H. Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of Phaeophyceae // *Anticancer Res.* 1993. V. 13. P. 2045–2052.
- Jasani B., Navabi H., Adams M. Ampligen: A potential Toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer // *Vaccine.* 2009. V. 27. P. 3401–3404.
- Jiang Z., Okimura T., Yokose T., Yamasaki Y., Yamaguchi K., Oda T. Effects of sulfated fucan ascophyllan from the brown Alga *A. nodosum* on various cell lines: a comparative study on ascophyllan and fucoidan // *J. Biosci. Bioeng.* 2010. V. 110. P. 113–117.
- Jin J.O., Song M.G., Kim Y.N., Park J.I., Kwak J.Y. The mechanism of fucoidan-induced apoptosis in leukemic cells: involvement of ERK1/2, JNK, glutathione and nitric oxide // *Mol. Carcinog.* 2010. V. 49. P. 771–782.
- Kanzler H., Barrat F.J., Hessel E.M., Coffman R.L. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists // *Nat. Med.* 2007. V. 13. P. 552–559.
- Kawamoto H., Miki Y., Kimura T., Tanaka K., Nakagawa T., Kawamukai M., Matsuda H. Effects of fucoidan from Mozuku on human stomach cell lines // *Food Science and Technology Res.* 2006. V. 12. № 3. P. 218–222.
- Khanavi M., Nabavi M., Sadati N., Ardekani M.S., Sohrabipour J., Nabavi S.M.B., Ghaeli P., Ostad S.N. Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines // *Biol. Res.* 2010. V. 43. P. 31–37.
- Kim E.J., Park S.Y., Lee J.Y., Park J.H.Y. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells // *BMC Gastroenterology.* 2010. V. 10. P. 68–77.
- Kitasato K. Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells // *Planta Med.* 2006. V. 20. P. 125–134.
- Koyanagi S., Tanigawa N., Nakagawa H., Soeda S., Shime-no H. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities // *Biochem. Pharmacol.* 2003. V. 65. P. 173–179.
- Krieg A.M. Development of TLR9 agonists for cancer therapy // *J. clin. Invest.* 2007. V. 117. P. 1184–1194.
- Kumar P., Miller A.I., Polverini P.J. p38 MAPK mediates gamma-irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-Act-Bcl-2 pathway // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 43352–43360.
- Lee N.Y., Ermakova S.P., Choi H.K., Kusaikin N.M., Shevchenko N.M., Zvuagintseva T.N. Fucoidan from *L. cichorioides* inhibits AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cells // *Mol. Carcinog.* 2008a. V. 47. P. 629–637.
- Lee N.Y., Ermakova S.P., Zvuagintseva T.N., Kang K.W., Dong Z., Choi H.S. Inhibitory effect of fucoidan on activation of epidermal growth factor receptor and cell transformation in JB6 C141 cells // *Food Chem. Toxicol.* 2008b. V. 46. P. 1793–1800.
- Li H., Lindenmeyer F., Grenet C., Opolon P., Menashi S., Soria C., Yeh P., Pericauded M., Lu H. AdTIMP-2 inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis, and prolongs survival in mice // *Hum. Gene Ther.* 2001. V. 12. № 5. P. 515–526.
- Lins K.O.A.L., Bezerra D.P., Alves A.P.N.N., Alenkar N.M.N., Lima M.W., Torres V.M., Farias W.R.L., Pessoa C., de Moraes M.O., Costa-Lotufo L. // *J. of Applied Toxicology.* 2008. V. 29. № 1. P. 20–26.
- Liu X.L., Liu D.Y., Wang Y.Q. Immunomodulation and antitumor activity of fucoidan from *Undaria pinnatifida* in vitro // *Chinese J. of Microecology.* 2010. V. 12. P. 152–158.

- Liu J.M., Haroun-Bouhedja F., Boisson-Vidal C. Analysis of the *in vitro* inhibition of mammary adenocarcinoma cell adhesion by sulphated polysaccharides // *Anticancer Res.* 2000. V. 20. P. 3265–3271.
- Liu J.M., Bignon J., Haroun-Bouhedja F., Bittoun P., Vassy J., Fermandjian S., Wdizczak-Bakala J., Boisson – Vidal C. Inhibitory effect of fucoidan on the adhesion of adenocarcinoma cells to fibronectin // *Anticancer Res.* 2005. V. 25. P. 2129–2133.
- Magalhaes K.D., Costa L.S., Fidelis G.P., Oliveira R.M., Nobre L.T.D.B., Dantas-Santos N., Camara R.B.G., Albuquerque I.R.L., Cordeiro S.L., Sabry D.A., Costa M.S.S.P., Alves L.G., Rocha H.A.O. Anticoagulant, antioxidant and antitumor activities of heterofucans from the seaweed *Dictiopteris delicatula* // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12. P. 3352–3365.
- Mantovani A. Macrophage diversity and polarization: *in vivo* veritas // *Blood.* 2006. V. 108. № 2. P. 408–409.
- Maruyama H., Tamauchi H., Hashimoto M., Nakano T. Antitumor activity and immune response of Mecabu fucoidan extracted from sporophyll of *Undaria pinnatifida* // *Planta Med.* 2003. V. 17. P. 245–249.
- Maruyama H., Tamauchi H., Iizuka M., Nakano T. The role of NK cells in antitumor activity of dietary fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls (Mecabu) // *Planta Med.* 2006. V. 72. P. 1415–1417.
- Mayer F.M.S., Krotz L. Biological activity in *Macrocystis pyrifera* from Argentina: sodium alginate, fucoidan and laminaran. Antitumor, cytotoxicity and humoral immune response // *Hydrobiologia.* 1987. V. 151/152. P. 483–487.
- Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Hill A.M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm // *J. Immunol.* 2000. V. 164. P. 6166–6173.
- Moon H.J., Lee S.H., Ku M.J., Yu B.C., Jeon M.J., Jeong S.H., Stonik V.A., Zvuagintseva T.N., Ermakova S.P., Lee Y.H. Fucoidan inhibits UVB-induced MMP-1 promoter expression and down regulation of type 1 procollagen synthesis in human skin fibroblasts // *Eur. J. Dermatol.* 2009a. V. 19. P. 129–134.
- Moon H.J., Park K.S., Ku M.J., Lee M.S., Jeong S.H., Imbs T.I., Zvuagintseva T.N. Effect of *Costaria costata* fucoidan on expression of matrix metalloproteinase-1 promoter mRNA and protein // *J. Nat. Prod.* 2009b. V. 72. P. 1731–1734.
- Mosser D.M. The many faces of macrophage activation // *J. Leucocyte Biology.* 2003. V. 73. P. 209–212.
- Nakayasu S., Soegima R., Yamaguchi K., Oda T. Biological activities of fucose-containing polysaccharide ascophyllan isolated from the brown algae *Ascophyllum nodosum* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009. V. 73. № 4. P. 961–964.
- Narazaki M., Segarra M., Tosato G. Sulfated polysaccharides identified as inducers of neuropilin-1 internalization and functional inhibition of VEGF₁₆₅ and semaphorin 3A // *Blood.* 2008. V. 8. P. 4126–4136.
- Okamoto Y., Minamis S., Tsuka T., Miki Y. Fucoidan having antitumor activity. Patent IPC8 Class AA61K31737F1. USPC Class 514. 54. 2012. 03.2012. Patent № 2012/0065158A1.
- Park H.Y., Han M.H., Park C., Jin C.Y., Kim G.Y., Choi I.W., Kim N.D., Nam T.J., Kwon T.K., Choi Y.H. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF-κB, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells // *Food. Chem. Toxicol.* 2011a. V. 8. P. 1745–1752.
- Park H.S., Kim G.Y., Nam T.J., Kim D., Choi H. Antiproliferative activity of fucoidan was associated with the induction of apoptosis and autophagy in AGS human gastric cancer cells // *J. Food. Sci.* 2011. V. 76. P. T77–T83.
- Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T., Williams L.R., Clark G.F. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 29. P. 21770–21776.
- Philchenkov A., Zavelevich M., Imbs T., Zvuagintseva T., Zaporozhets T. Sensitization of human malignant lymphoid cells to etoposide by fucoidan, a brown seaweed polysaccharide // *Exp. Oncol.* 2007. V. 29. № 3. P. 181–185.
- Riou D., Collic-Jouault S., Pinczon du sel D., Bosch S., Slavoshian S., LeBert V., Tomasoni S., Siquin C. Antitumor and antiproliferative effects of a fucan extracted from *Ascophyllum nodosum* against a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line // *Anticancer Res.* 1996. V. 16. P. 1213–1218.
- Rocha H.A., Franco C.R., Trindade E.S., Veiga S.S., Leite E.L., Nader H.B., Dietrich C.P. Fucan inhibits chinese hamster ovary cell (CHO) adhesion to fibronectin by binding to the extracellular matrix // *Planta Med.* 2005. V. 71. № 7. P. 628–633.
- Roszkowsky N., Beuth J., Ko H.L. Blocking of lectin-like adhesion molecules on pulmonary cells inhibits lung sarcoma L-1 colonization in BALB/c-mice // *Experientia.* 1989. V. 45. P. 584–588.
- Sakai T., Kitano H., Yu F., Hirosaki J.P., Nakayama S., Kojima K., Kimura H., Nakanishi Y., Katayama K. 425.T.C3.Pat. 20010034335 US. Apoptosis inducers. 2001.
- Senni K., Gueniche F., Foucault-Bertaud A., Igondjo-Tchen S., Fioretti F., Collic-Jouault S., Durand P., Guezennec J., Godeau G., Letoumeur D. // *Arch. of Biochem. and Biophys.* 2006. V. 445. № 1. P. 56–64.
- Schepetkin I.A., Faulkner C.L., Nelson-Overton L.K., Wiley J.A., Quinn M.T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopulorum* // *Int. Immunopharmacol.* 2005. V. 5. P. 1783–1799.
- Shurin M.R., Lu L., Kalinski P., Stewart-Akers A.M., Lotze M.T. Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy // *Springer Semin. Immunopathol.* 1999. V. 21. P. 339–344.

- Soeda S., Kozako T., Iwata K., Shimeno H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: its possible mechanism of action // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1. P. 127–134.
- Sogawa K., Matsuda M., Okutani K. Induction of apoptosis by a marine microalgal polysaccharide in a human leukemic cell line// J. Marine Biotechnology. 1998. V. 4. № 6. P. 241–243.
- Stoian I., Oros A., Moldoveanu E. Apoptosis and free radicals // Biochem. And Mol. Med. 1996. V. 59. P. 93–97.
- Synytsya A., Kim W.J., Kim S.M., Pohl R., Synytsya A., Kvasnicka F., Copicova J., Park Y.I. Structure and antitumor activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*// Carbohydr. Polymers. 2010. V. 81. № 1. P. 41–48.
- Takahashi M., Suzuki T., Seino H. Mori H. Antitumor effect of seaweeds IV. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from *Sargassum kjellmanianum*// Jpn. J. Exp. Med. 1984. V. 54. № 4. P. 143–151.
- Takeda K., Smyth M.J., Cretney E. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis – inducing ligand in immune surveillance against tumor development // J. Exp. Med. 2002. V. 195. № 2. P. 161–169.
- Takeda K., Tomimori K., Kimura R., Ishikawa C., Nowling T.K., Mori N. Antitumor activity of fucoidan is mediated by nitric oxide released from macrophages // Int. J. Oncol. 2012. V. 40. № 1. P. 251–260.
- Teruya T., Takeda S., Yamashiro Y., Tako M. Anti-cancer cell activities of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* // 13th European Carbohydrate Symposium. 2005. Bratislava. P. 133.
- Tse K., Horner A.A. Update on toll-like receptor-directed therapies for human disease // Ann. Rheum. Dis. 2007. V. 66. P. 77–80.
- Usui T., Asari K., Mizuno T. Isolation highly purified “fucoidan” from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities // Agric. Biol. Chem. 1980. V. 44. P. 1965–1966.
- Vischer P., Buddecke E. Different action of heparin and fucoidan on arterial smooth muscle cell proliferation and thrombospondin and fibronectin metabolism // Eur. J. of Cell Biology. 1991. V. 56. № 2. P. 407–414.
- Wang H., Chui L.C.M., Ooi V.E.C., Put O.A.J. A potent antitumor polysaccharide from the edible *Hydroclathrus clathrus*// Botanica Marina. 2010. V. 53. № 3. P. 114–118.
- Wijesekara I., Pangestuti R., Kim S.K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae // Carbohydrate Polymers. 2011. V. 84. № 1. P. 14–21.
- Wu X.Z., Chen D. Effects of sulfated polysaccharides on tumor biology // West Indian Med. J. 2006. V. 55. № 4. P. 270–273.
- Yamamoto I., Takahashi M., Tamura E., Maruyama H. Antitumor effect of seaweeds. IV. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from *Sargassum kjellmanianum*// Bot. Mar. 1982. V. 20. P. 332–345.
- Yamamoto I., Takahashi M., Tamura H. Antitumor activity of edible brown marine algae: effect of crude fucoidan fractions prepared from edible brown seaweeds against L-1210 leukemia // Proc. Int. Seaweed Symp. 1984. V. 11. P. 145–151.
- Yamasaki-Miyamoto Y., Yamasaki M., Tachibana H., Yamada K. Fucoidan induces apoptosis through activation of caspase-8 on human breast cancer MCF-7 cells // J. Agric. Food. Chem. 2009. V. 57. № 18. P. 8677–8682.
- Yang C., Chung D., Shin I.S., Lee H.J., You Y.J. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida* // Int. J. of Biol. Macromolecules. 2008. V. 43. P. 433–437.
- Yang Y.J., Nam S.J., Kong G., Kim M.K. Effect of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida* // Brit. J. Nutr. 2009. V. 8. P. 19–28.
- Ye J., Li Y.P., Teruya K., Katakura Y., Ichikawa A., Eto H., Hosoi M., Hosoi M., Nishimoto S., Shirahata S. Enzyme-digested fucoidan extracts derived from seaweed Mozuku of *Cladosiphon novae-caledoniae* kylin inhibit invasion and angiogenesis of tumor cells // Cytotechnology. 2005. V. 47. P. 117–126.
- Zhang Z., Teruya K., Eto H., Shirahata S. Fucoidan extract induces apoptosis in MCF-7 cells via a mechanism involving the ROS-dependent JNK activation and mitochondria-mediated pathways// PloS One. 2011. V. 6. P. 27441–27445.
- Zitvogel L., Tesniere A., Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion // Nat. Rev. Immunol. 2006. V. 6. P. 715–727.
- Zoratti M., Szabo I. The mitochondrial permeability transition // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1241. № 2. P. 139–176.
- Zvuagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhov A.O., Krupnova T.N., Sundukova E.V., Isakov V.V. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the on the developmental conditions// J. Exp. Marine Biol. Ecol. 2003. V. 294. № 1. P. 1–13.
- Zvuagintseva T.N., Shevchenko N.M., Nazarenko E.L., Gorbach V.I., Urvantseva A.M., Kiseleva M.I., Isakov V.V. Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian Far-East. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans // J. Exp. Marine Biol. Ecol. 2005. V. 320. № 2. P. 123–131.

Antitumor Effects of Sulfated Polysaccharides Produced from Marine Algae

T. S. Zaporozhets¹, S. P. Ermakova², T. N. Zvyagintseva², N. N. Besednova¹

¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Vladivostok, Russia

²Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Division, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

The present-day concepts concerning mechanisms of antitumor effects of alga sulfated polysaccharides are considered. The antiproliferative, apoptotic, and antiangiogenic effects of these biopolymers are shown. The results of studying the antitumor action of fucoidans produced from Far Eastern brown algae are presented. The authors' and literature data allow one to consider that sulfated polysaccharides of marine algae may be the basis for the development of next generation drugs with antitumor effects.