

© Коллектив авторов, 2015

Е. Д. Облущинская<sup>1</sup>, М. Н. Макарова<sup>2</sup>, О. Н. Пожарицкая<sup>2</sup>, А. Н. Шиков<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ОБРАБОТКИ НА ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И АНТИКОАГУЛЯНТНЫЕ СВОЙСТВА СУХОГО ЭКСТРАКТА ФУКУСА

<sup>1</sup> Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН, Мурманск, Россия.

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский институт фармации, Санкт-Петербург, Россия.

Изучено влияние ультразвуковой обработки на химический состав и антикоагулянтные свойства сухого экстракта фукуса пузырчатого (СЭФ), полученного при комплексной переработке слоевищ фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus* L.). Установлено, что ультразвуковая обработка на стадии экстрагирования шрота фукуса оказывает влияние на качественный состав сахаров и количественное содержание фукоидана, сульфатных групп и полифенолов. СЭФ, полученный с использованием ультразвуковой обработки, проявил более высокую антикоагулянтную активность при местном применении на крысах линии Wistar, сходную с действием препарата сравнения гепариновой мастью.

**Ключевые слова:** экстракт фукуса; ультразвуковая обработка; *Fucus vesiculosus* L.

Фукусовые водоросли — перспективное сырье для получения биологически активных веществ (БАВ). Они содержат полисахарид фукоидан, а также полифенолы, липиды и другие биологически активные компоненты. Сырьевую базу фукоидов на Белом и Баренцевом море и, в частности, запасы фукуса пузырчатого специалисты оценивают как значительную (более 300 тыс. т). В настоящее время проводится активное исследование антикоагулянтных свойств фукоидана [1, 2], в результате которого установлено, что фукоидан влияет на реологию крови, подобно гепарину. Полифенолы бурых водорослей, представленные в основном флороглюцином и его полимерами — флоротанинами, помимо антиоксидантных свойств, обладают способностью избирательно инактивировать действие ингибиторов плазмينا плазмы крови —  $\alpha$ 2-макроглобина и  $\alpha$ 2-плазминного ингибитора — и рассматриваются как потенциальные препараты для лечения тромбозов [3].

В клинической практике Российской Федерации гепарин — единственный антикоагулянт прямого действия, и разработка препаратов, имеющих гепариноподобное действие, особенно актуальна. Гепариновая мазь применяется как антикоагулянтное средство, обладает местным противовоспалительным и антиэкзудативным действием. Однако гепарин является лекарственным препаратом животного происхождения, его применение в клинике может вызывать ряд побочных эффектов: снижение свертываемости крови, тромбоцитопению, аллергические реакции и др. Гепарин плохо проникает через неповрежденную кожу и слизистые оболочки, вследствие этого обладает слабым системным резорбтивным действием. При длительном применении на большие поверхности возможны геморрагические осложнения [4]. Учитывая недостатки лекарственного препарата «гепариновая мазь», актуален

поиск новых высокоэффективных, малотоксичных антикоагулянтов прямого действия растительного происхождения. Наиболее перспективными являются соединения полисахаридной природы и, в частности, водорослевый полисахарид фукоидан.

Стандартизация лекарственных препаратов из БАВ бурых водорослей является важной, но малоизученной проблемой. Фитохимический состав водорослей зависит от вида растения, условий их произрастания, сезона сбора и других факторов. Также существенное влияние на состав и свойства получаемых водорослевых препаратов оказывает технология их получения.

В Мурманском морском биологическом институте Кольского научного центра РАН разработаны и запатентованы технологии комплексной переработки фукуса пузырчатого [5, 6]. В результате обе технологии позволяют получать на одном из этапов сухие экстракты фукуса (СЭФ-1 и СЭФ-2), отличающиеся друг от друга физико-химическими характеристиками. Оба экстракта представляют собой полисахаридные комплексы, содержащие в основном фукоидан. Ранее была исследована иммуномодулирующая активность СЭФ-1, что позволило разработать препарат в виде капсул с гранулами СЭФ-1 [7].

Цель данной работы — изучение влияния ультразвуковой обработки на химический состав сухих экстрактов фукуса, и исследования их антикоагулянтных свойств.

### Экспериментальная химическая часть

В качестве сырья для получения СЭФ использовали слоевища фукуса пузырчатого (*Fucus vesiculosus* L.), собранные в экологически чистых районах Баренцева моря [8] в августе 2010 г. (Сбор и идентификация сырья проведена Облущинской Е. Д., образец депонирован в коллекции лаборатории альгологии ММБИ

№ 08.2010.Ф. V. D. Z.). Воздушно-сухие слоевища измельчали и последовательно обрабатывали органическим экстрагентом, этиловым спиртом, спирто-водными смесями в соответствии с запатентованной технологической схемой [5, 6]. Для получения полисахаридного комплекса СЭФ-1 шрот экстрагировали 5 % раствором этанола при рН 1,5 (контроль рН-метром) и времени настаивания 6 ч при температуре 60 °С, соотношение сырье — экстрагент 1:10, методом перколяции с принудительной циркуляцией. В результате был получен СЭФ-1, химический состав которого представлен в табл. 1.

Модификация технологии получения СЭФ на стадиях экстрагирования [6], в частности обработка ультразвуком, изменение температурных режимов и другие приемы, позволили получить новый полисахаридно-фенольный комплекс СЭФ-2, химическая характеристика которого представлена в табл. 1.

Для получения СЭФ-2 шрот водорослей экстрагировали 4 ч при температуре 35 °С и рН 4 методом перколяции с периодической ультразвуковой обработкой. В качестве источника ультразвука использовали ультразвуковую баню (Branson DHT-3510, 42 кГц, 335W). Включение ультразвука производили на 20 мин каждый час настаивания.

Оба экстракта СЭФ-1 и СЭФ-2 получали в количестве 5 серий. В табл. 1 представлены средние значения химических характеристик экстрактов.

Для изучения антикоагулянтного действия образцов СЭФ была приготовлена мазь следующего состава, %:

- Сухой экстракт фукуса (СЭФ-1 или СЭФ-2) — 15;
- Ланолин — 10;
- Оливковое масло — 10;
- ПАВ — 1;
- Консерванты — 1;
- Вода очищенная — остальное (63 %).

Качественный анализ подлинности СЭФ проводили, обрабатывая 2 % водный раствор экстракта равным объемом 96 % спирта. В результате получали хлопьевидный осадок (полисахариды). При добавлении к 2 % раствору экстракта концентрированной сер-

ной кислоты и 1 % раствора L-цистеина появлялось желтое окрашивание с максимумами при 396 и 430 нм (фукоидан).

Количественную оценку содержания фукоидана проводили спектрофотометрическим методом с использованием реакции L-цистеина с серной кислотой [9]. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора фукозы 0,015 г/мл (Sigma). Спектрофотометрические определения проводили на спектрофотометре UV VIS (“Jenway”, США).

Количественную оценку содержания моносахаридов в виде полных ацетатов проводили методом ГЖХ на приборе Hewlett-Packard 5890 (США) с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой НР Ультра-1 (25 м × 0,2 мм, толщина пленки поперечно-сшитого метилсиликона 0,33 мкм), интегратором НР 3393А. Условия анализа: температура инжектора 290 °С, температура детектора 300 °С, газ-носитель — азот [10].

Содержание сульфатных групп в образцах полисахаридов определяли турбодиметрическим методом [11].

Общее содержание полифенолов в пересчете на флороглюцин оценивали методом Фолина-Чокольтеу [12].

#### Экспериментальная биологическая часть

Биологические исследования проводили на крысах-самцах ( $n = 6$ ) линии Wistar массой от 294 до 372 г. До начала эксперимента животные были акклиматизированы в течение 14 дней и распределены на 6 групп методом модифицированной блочной рандомизации. 1-я группа — интактная, крысам 2-й и 3-й групп наносили мазь с СЭФ-1 в дозах 3,5 и 7 мг/кг соответственно, 4-й и 5-й группам наносили мазь с СЭФ-2 также в дозах 3,5 и 7 мг/кг, 6-й группе наносили препарат сравнения “гепариновую мазь” (производство “Нижфарм”) в дозе 3,5 мг/кг. Препараты наносили на предварительно освобожденный от шерсти участок кожи размером

#### Результаты анализа физико-химических показателей сухих экстрактов фукуса ( $M \pm m$ )

Показатель	СЭФ-1	СЭФ-2
Количественное содержание фукоидана методом спектрофотометрии, %	75,6 ± 3,0	80,3 ± 2,4
Количественное содержание моносахаридов методом ГЖХ, %:		
Фукоза (Fuc)	35,5 ± 1,2	43,0 ± 0,9
Ксилоза (Xyl)	0,9 ± 0,2	2,3 ± 0,1
Манноза (Man)	1,3 ± 0,3	3,5 ± 0,2
Глюкоза (Glu)	3,9 ± 0,4	2,0 ± 0,1
Галактоза (Gal)	1,3 ± 0,2	4,3 ± 0,2
Уроновые кислоты	1,7 ± 0,2	3,4 ± 0,3
Молярные отношения моносахаридов Fuc/Xyl/Man/Clu/Gal	1/0,03/0,04/0,11/0,04	1/0,05/0,08/0,05/0,1
Сульфаты, SO <sub>3</sub> Na, %	21,3 ± 1,7	28,8 ± 2,3
Молярные отношения Fuc/ SO <sub>4</sub> <sup>2+</sup>	1/0,6	1/0,7
Полифенолы в пересчете на флороглюцин, %	—*	18,5 ± 0,8

\* Следы.

3 × 5 см. АЧТВ и ПВ оценивали в 0-й и 7-й дни эксперимента, кровь забирали из хвостовой вены.

Для исследования антикоагулянтного действия 2 образцов мази с СЭФ-1 и СЭФ-2 и препарата сравнения “гепариновая мазь” определяли показатели свертываемости крови крыс, изменяющиеся под воздействием гепарина: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), и протромбиновое время (ПВ).

Измерение АЧТВ (с) проводили на полуавтоматическом коагулометре ЭМКО АПГ-2-02П с помощью набора АЧТВ-тест фирмы “Ренам”, Россия (ПГ-7/1). Измерение ПВ (с) проводили на полуавтоматическом коагулометре ЭМКО АПГ-2-02П с помощью набора Техпластин-Тест ООО фирмы “Технология-Стандарт”, Россия.

Все физико-химические данные получены в пятикратной повторности, статистически обработаны с помощью пакета статистических программ Excel и Statistica 6. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента, критическое значение уровня значимости принимали  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Препараты из водорослей сложны для стандартизации из-за изменчивости фитохимического состава. Водорослевые фукоиданы, основным моносахаридным звеном которых является L-фукоза, могут содержать в своем составе галактозу, ксилозу, маннозу, глюкозу, уроновые кислоты в различных количествах, что зависит от видоспецифичности водорослей и условий произрастания. В нашем исследовании для получения сухих экстрактов использованы водоросли одного вида (фукус пузырчатый), собранные в одном и том же месте одновременно, поэтому различия в составе мономеров сырья были минимальны.

Другим фактором, существенно влияющим на свойства комплексных фитопрепаратов, является технология получения. Для интенсификации процесса получения экстракта СЭФ-2 использовали ультразвук. Экстрагирование с применением ультразвука ускоряет процесс извлечения БАВ из сырья, обеспечивая более полное извлечение действующих веществ — полисахарида фукоидана и полифенолов [13].

Сухой экстракт СЭФ-2, полученный после обработки ультразвуком, существенно отличается от СЭФ-1 по целому ряду показателей (таблица). В частности, общее содержание фукоидана статистически достоверно увеличилось более чем на 4,7 % ( $p < 0,05$ ), в первую очередь, за счет увеличения содержания фукозы на 7,5%. Кроме того, изменилось молярное отношение моносахаридов и фукозы/сульфатных групп, что является наглядным показателем структурных отличий полученных фукоиданов.

В литературе описан состав различных фукоиданов, в том числе и полученных из фукуса пузырчатого [1, 2, 14, 15]. Показано, что в зависимости от способа получения этого полисахарида моносахаридный состав

значительно варьирует. Так после экстракции слоевищ фукуса пузырчатого 2 % раствором хлорида кальция методом 3-кратной мацерации с перемешиванием, дальнейшего осаждения полисахаридного комплекса цетилтриметиламмония бромидом и очистки фукоидана методом многократного переосаждения этанолом, сухой экстракт состоял из 26,1 % фукозы, 2,2 % глюкозы, 2,4 % ксилозы, 5,0 % галактозы, 3,1 % маннозы [1].

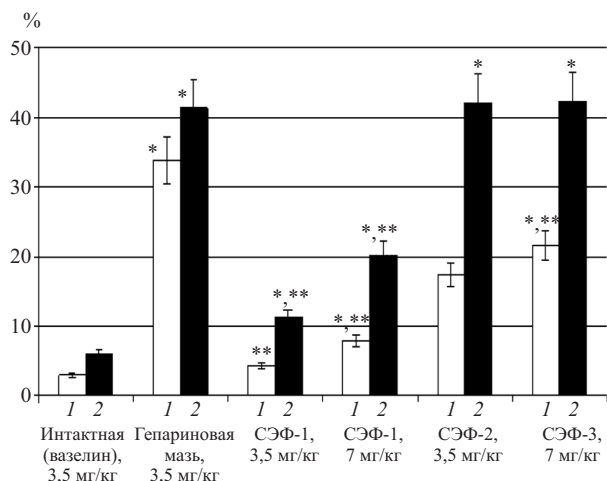
При исследовании химических свойств фукоиданов из фукуса зубчатого (*F. serratus*) установлено, что после экстракции сырья раствором хлорида кальция был получен фукоидан следующего состава: 32,8 % фукозы, 24,4 % глюкозы, 2,9 % ксилозы, 2,6 % галактозы, 1,8 % маннозы [14]. При последующей обработке этого полисахарида ионообменной хроматографией был получен фукоидан, содержащий в 1,7 раза больше фукозы, в 1,4 раза больше ксилозы, а содержание глюкозы уменьшилось до 0,6 %. Содержание остальных моносахаридов осталось без изменений.

В литературе описана комплексная переработка бурых водорослей *F. evanescens*: слоевища предварительно обрабатывали этанолом, затем остаток водорослей экстрагировали 0,1 М раствором соляной кислоты. Полученный экстракт концентрировали, нейтрализовали и осаждали фукоидан. В его составе обнаружили 74 % фукозы, 4 % глюкозы, 6 % ксилозы, 11 % галактозы, 1 % маннозы [15]. При использовании в качестве экстрагента горячей воды из того же вида водорослей по той же технологической схеме был получен фукоидан другого мономерного состава (82 % фукозы, 3 % ксилозы, 4 % галактозы, 4 % маннозы). Сравнивая 2 образца фукоидана в данном случае, можно сделать вывод, что замена экстрагента существенно отражается на составе мономеров этого полисахарида.

В нашем исследовании применение новых технологических приемов (обработка ультразвуком на стадии экстрагирования сырья) привели к получению фукоидансодержащих экстрактов разного мономерного состава с разным молярным отношением моносахаридов (таблица). Кроме того, СЭФ-2 отличается от СЭФ-1 и по содержанию полифенолов. Экстракт СЭФ-2 содержит более 18% полифенолов в пересчете на флороглюцин.

Известно, что изменения в химическом составе препаратов отражаются на фармакологических свойствах. В частности, биологическая активность фукоиданов зависит от моносахаридного состава, содержания сульфатных групп [1, 2], состав и концентрация полифенолов также влияют на фармакологические свойства водорослевых экстрактов [3].

Проведенное нами исследование антикоагулянтной активности сухих экстрактов фукуса в виде мази при накожном нанесении позволило получить следующие результаты. Местное применение СЭФ-2 вызывало статистически достоверное увеличение протромбинового времени, что свидетельствует о влиянии этого экстракта на внешний и общий путь свертывания крови. СЭФ-1 оказывал слабый антикоагулянтный эффект по сравнению с СЭФ-2 и препаратом сравнения “гепариновая мазь”. При этом статистически достоверное



Влияние экстракта фукуса на показатели свертываемости крови после 7 дней местного применения: \* – различия статистически значимы по сравнению с интактной группой ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента); \*\* – различия статистически значимы по сравнению с группой Контроль (гепариновая мазь) ( $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента). 1 – Изменение АЧТВ, 2 – изменение ПВ.

удлинение АЧТВ также наблюдали при нанесении СЭФ-2, достигая уровня контрольной группы (рисунок). Местное применение экстракта СЭФ-1 не оказывало влияния на АЧТВ по сравнению с интактной группой. У животных интактной группы не происходило значимых статистически достоверных изменений показателей АЧТВ и ПВ, что является подтверждением адекватности применяемой методики.

Интересно отметить, что СЭФ-1 оказывает дозозависимое влияние на внутренний и общий путь свертывания крови, а СЭФ-2 — на внешний и общий путь свертывания крови, т.е. механизм действия этих 2 экстрактов не одинаков. Использование ультразвуковой обработки на стадии экстрагирования шрота фукуса пузырчатого привело к получению нового образца СЭФ-2. СЭФ-2 существенно отличается от СЭФ-1 по содержанию фукоидана, включая его моносахаридный состав, а также по содержанию полифенолов, сульфат-

ных групп. Установленные отличия в химическом составе повлияли на разную антикоагулянтную активность исследуемых экстрактов фукуса пузырчатого.

Таким образом, исследование антикоагулянтной активности *in vitro* 2 образцов СЭФ, наносимых наружно в виде мазей, показало увеличение времени свертывания крови в АЧТВ-, ПВ-тестах, в большей степени оказываемое препаратом СЭФ-2, аналогичное с действием препарата сравнения “гепариновая мазь”.

Экстракт фукуса СЭФ-2 перспективен как аналог гепарина и может быть рекомендован для дальнейших исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Н. А. Ушакова, Е. Е. Морозевич, Н. Е. Устюжанина и др., *Биомед. химия*, **54**(5), 597 – 606 (2008).
2. T.-S. Vo., S.-K. Kim, *J. Func. Foods*, **5**, 16 – 27 (2013).
3. Y. Fukuyama, M. Kodama, I. Miura, et al., *Chem. Pharm. Bul.*, **37**(2), 349 – 353 (1989).
4. P. J. Harvison, *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier Inc (2007), pp. 1 – 6.
5. Патент РФ 2337571; *Бюл. изобрет.*, № 31 (2008).
6. Патент РФ 2506089; *Бюл. изобрет.*, № 4 (2014).
7. Е. Д. Облучинская, *Хим.-фарм. журн.*, **43**(6), 22 – 26 (2009), *Pharm. Chem. J.*, **43**(6), 328 – 332 (2009).
8. Доклады по охране окружающей среды и рациональному использованию природных ресурсов Мурманской области в 2007, 2008, 2009, 2010 году, ООО “МИП-999”, Мурманск (2008; 2009; 2010, 2011).
9. А. И. Усов, Г. П. Смирнова, Н. Г. Клочкова, *Биоорган. химия*, **27**(6), 444 – 448 (2001).
10. Дж. Слонекер, *Методы исследования углеводов*, Мир, Москва (1975), сс. 22 – 25.
11. K. S. Dodgson, *Biochem. J.*, **78**(2), 312 – 319 (1961).
12. Л. А. Сиренко, А. И. Сакевич, Л. Ф. Осипов и др., *Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике*, Наукова думка, Киев (1975), сс. 153 – 156.
13. Г. И. Молчанов, *Ультразвук в фармации*, Медицина, Москва (1980).
14. M. I. Bilan, A. A. Grachev, A. S. Shashkov, et al., *Carbohydr. Res.*, **341**, 238 – 254 (2006).
15. Патент РФ 2240816; *Бюл. изобрет.*, № 33 (2004).

Поступила 30.05.13

## EFFECT OF ULTRASONIC TREATMENT ON THE CHEMICAL PROPERTIES AND ANTICOAGULANT ACTIVITY OF FUCUS DRY EXTRACT

E. D. Obluchinskaya<sup>1</sup>, M. N. Makarova<sup>2</sup>, O. N. Pozharitskaya<sup>2</sup>, and A. N. Shikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Murmansk Marine Biology Institute, Kola Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Murmansk, Russia

<sup>2</sup> St. Petersburg Institute of Pharmacy, St. Petersburg, 195067 Russia

The influence of ultrasonic treatment (UST) on the chemical composition and anticoagulant properties of dry extract of *Fucus vesiculosus* seaweed, obtained upon the complex processing of raw material was studied. It was found that UST at the extraction stage influences the qualitative and quantitative composition of sugars and the content of fucoidan, sulfate groups, and polyphenols. The extract obtained using UST exhibited higher anticoagulant activity for local application in Wistar rats, which was comparable with the action of heparin preparation (reference preparation).

**Keywords:** fucus dry extract; ultrasonic treatment; *Fucus vesiculosus* L.