

Fukoidan – polisacharyd o wielokierunkowej aktywności biologicznej

¹Apteka przy ul. Daszyńskiego 30 w Krakowie

²Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Halina Ekiert

³Zakład Żywienia Człowieka, Instytut Zdrowia Publicznego, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

Kierownik Katedry: prof. dr hab. Halina Ekiert

FUCOIDAN – POLYSACCHARIDE WITH MULTIACTIVE BIOLOGICAL ACTIVITY

SUMMARY

Polysaccharides of natural origin play a strategic role in medicine, cosmetology and food industry. One of the most important and the best documented is their immunomodulating and anticancer activity. The best known are the polysaccharides of fungal and plant, mainly glucans β (1→3) with branching β (1→6) and β (1→4). The research for new compounds with the structure and mechanism of physiological action caused scientific interest in marine organisms, especially algae. Marine organisms are still poorly explored source of substances with great biological potential. One of the most interesting substances studied in detail is a polysaccharide – fucoidan. This compound is made of molecules of α -L-fucopyranose which can be connected by bonds 1→3 and 1→3 bonds and 1→4 occur alternately. In order to obtain the branched structure in the main chain are also attached to the rest of α -L-fucopyranose, and additionally inorganic substituents are attached – the rest of the sulfate(VI), as well as organic acids such as D-glucuronic and acetyl rest. Fucoidan for the purposes of pharmaceuticals is derived from brown algae, especially from *Fucus* species and tissues of echinoderms. This compound has antioxidant, immunostimulating, anti-tumor, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral and anticoagulant activity. However, depending on the organism from which it is derived fucoidan is not differing significantly in chemical structure, and the power and profile of action.

KEYWORDS: ALGAE – FUCOIDAN – FUCUS – PHAEOPHYTA – POLYSACCHARIDES

Wstęp

Polisacharydy pochodzenia naturalnego odgrywają znaczącą rolę w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. α -Glukany są wypełniaczami tabletek czy pudrów, pełnią funkcję środków przeczyszczających, zmniejszających łaknienie (leczenie otyłości), osłaniających, opatrunkowych oraz krwiozastępczych. Najintensywniej badane są i zyskują coraz większe znaczenie w leczeniu, polisacharydy o działaniu immunoregulującym i przeciwnowotworowym. Szczególnie interesujące, ze względu na właściwości farmakologiczne, są polisacharydy otrzymywane z grzybów, głównie β -glukany. Po raz pierwszy właściwości immunostymulujące i przeciwnowotworowe ekstraktów pochodzących z owocników *Boletus edulis* wykazał w 1957 roku Lucas, podając je myszom chorym na mięsaka Sarcoma 180. Składniki ekstraktów nie zostały jednak zidentyfikowane (1).

Pierwsze leki przeciwnowotworowe, będące polisacharydami pochodzącymi z grzybów, wprowadzili do oficjalnej terapii Japończycy. Są to m.in. Lentinan (wyizolowany z owocników *Lentinula edodes* (Berk.) – twardziak jadalny), Krestin (z owocników *Trametes versicolor* (L.) Pilat – wrośniak różnobarwny) i Reishi (z owocników *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst – lakownica lśniaca). Źródłem immunoaktywnych polisacharydów są też owocniki wielu innych gatunków *Basidiomycota*, jak i ich hodowle mycelialne. Związki te mają najczęściej strukturę β -D-glukanów lub β -mannanów. O aktywności tych związków decydują: masa cząsteczkowa, rozpuszczalność w wodzie, ilość rozgałęzień i struktura III-rzędowa. Największą immunoaktywność posiadają glukany β (1→3) z rozgałęzieniami β (1→6) i β (1→4). Polisacharydy te w organizmie człowieka nie wywołują działań niepożądanych.

Działanie przeciwnowotworowe polisacharydów jest wielokierunkowe i kompleksowe. Ograniczają one uszkodzenie DNA komórek, obniżają stężenie karcynogenów w organizmie człowieka i hamują ich aktywację, a także rozwój komórek nowotworowych. Wiążą wolne rodniki, stymulują system odpornościowy organizmu, wywołują apoptozę. Dzięki zdolności do aktywowania systemu odpornościowego, mogą wspomagać leczenie nie tylko chorób nowotworowych, ale też zakaźnych. Istotną zaletą polisacharydów pochodzenia naturalnego jest to, że znoszą skutki uboczne chemioterapii, ponadto nie wykazują działania toksycznego na organizm człowieka (2). Polisacharydy z roślin wyższych o działaniu

niu immunostymulującym znajdują się między innymi w żelu aloesowym otrzymanym z *Aloe barbadensis*, ziele *Echinacea purpurea*, korzeniach *Panax ginseng* i owocach noni – *Morinda citrifolia* (3).

Polisacharydy są szeroko pozyskiwane z alg, np. z brunatnic. Brunatnice (*Phaeophyta*) to gromada alg z bardzo wysokim stopniem specjalizacji budowy plechy, która najczęściej ma postać rozgałęzionej nici. Jej przedstawiciele występują w formie pseudotkankowych, parenchymatycznych plech oraz charakteryzują się wysokim zróżnicowaniem morfologicznym i anatomicznym, mogą również posiadać duże rozmiary, nawet do ponad 100 m. Ich komórki są otoczone ścianą komórkową, zbudowaną odpowiednio po zewnętrznej i wewnętrznej stronie z warstwy celulozowej i pektynowej. Charakterystyczne dla tych organizmów jest to, że zawierają duże ilości kwasu alginowego i fukoidanu – polisacharydu, który jest typowym związkiem dla tej gromady (4).

Budowa i pochodzenie fukoidanu

Fukoidan jest polisacharydem zbudowanym z cząsteczek α -L-fukopiranozy, które mogą być ze sobą połączone tylko za pomocą wiązań 1→3 lub wiązań 1→3 i 1→4 występujących na przemian (ryc. 1).

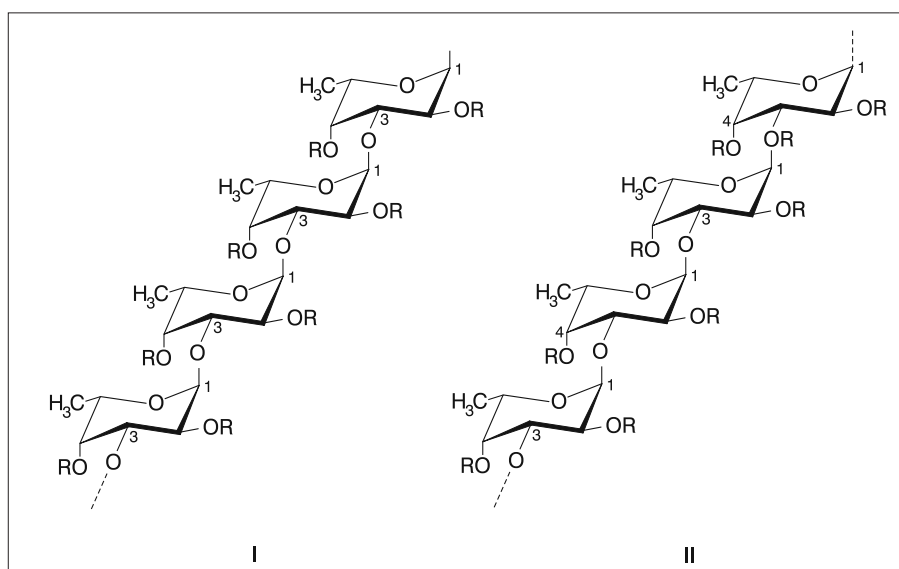
Rozgałęzioną strukturę fukoidanu zawdzięcza przyłączeniu do głównego łańcucha reszt α -L-fukopiranozy, a także podstawników nieorganicznych, takich jak reszty siarczanowe(VI), jak również organicznych, takich jak kwas D-glukuronowy i reszty acetylowe. Ze struktury fukoidanu udało się również wyizolować monosacharydy, takie jak galaktoza, ksyloza, manno-

za, glukoza oraz kwas uronowy, jednak ich lokalizacja w polimerze, jak do tej pory, pozostaje nieznana (5, 6). Podstawowa podjednostka struktury fukoidanu, czyli fukoza, ma również zastosowanie w preparatyce farmaceutycznej i w kosmetologii, jako związek przedłużający trwałość preparatów.

Fukoidan pozyskiwany jest z substancji międzykomórkowej brunatnic, takich jak *Fucus vesiculosus* – morskocyn pęcherzykowany (Farmakopea Polska XI) (ryc. 2), *Fucus evanescens*, *Fucus serratus* – morskocyn piłkowany (Farmakopea Polska XI), *Fucus distichus*, *Laminaria saccharina*, *Laminaria digitata* – listownica palczasta, *Cladosiphon okamuranus*, *Ascophyllum nodosum* – workoliść członowaty (Farmakopea Polska XI), *Undaria pinnatifida* – Undaria pierzastozielona i *Ecklonia cava*.



Ryc. 2. *Fucus vesiculosus* – morskocyn pęcherzykowany (fot. Tamara Mastalerz).



Ryc. 1. Dwa rodzaje budowy fukoidanu: I – zbudowany z wiązań 1→3, II – zawiera połączone ze sobą cząsteczki fukopiranozy połączone ze sobą naprzemiennie wiązaniami 1→3 oraz 1→4. R – oznacza miejsce potencjalnego przyłączenia się grupy acetylowej lub siarczkowej(VI).

Podobny do niego fukan udało się wyizolować z bezkręgowców morskich – szkarłupni: z galaretki otaczającej jaja jeżowca (*Lytechinus variegatus*, *Arbacia lixula*) oraz nabłonka innego gatunku szkarłupni – *Ludwigothurea grisea* (5, 7).

Fukoidany pozyskiwane z różnych rodzajów brunatnic mają nieregularną strukturę, przez co różnią się między sobą, a to przekłada się na ich działanie i aktywność biologiczną. Natomiast fukoidany pozyskiwane z bezkręgowców charakteryzują się regularną strukturą, jednak dostępne są w bardzo ograniczonych ilościach (5). Opisane są obecnie przynajmniej dwa rodzaje fukoidanu: F-fukoidan, który składa się w 95% z sulfonowanych estrów glukozy, i U-fukoidan, w którego składzie znajduje się 20% kwasu glukuronowego.

Jak do tej pory nie stwierdzono toksycznego działania fukoidanu pochodzącego z różnych brunatnic w modelu zwierzęcym *in vitro*, jak i *in vivo*, nawet przy bardzo wysokim poziomie spożycia. Na podstawie badań klinicznych również nie zanotowano negatywnego wpływu fukoidanu na organizm człowieka – podawano go w ilości 1 g dziennie przez trzy miesiące lub 3 g dziennie przez 12 dni (8).

Przeprowadzone badania potwierdziły działania fukoidanu, takie jak przeciwnowotworowe, przeciwzakrzepowe, przeciwwirusowe, przeciwzapalne czy antyoksydacyjne. Jednak w zależności od organizmów, z jakich są pozyskiwane, fukoidany różnią się nie tylko budową chemiczną, ale również siłą i profilem działania (7).

Poniżej przedstawiono właściwości lecznicze fukoidanu pozyskiwanego z różnych organizmów.

Właściwości przeciwnowotworowe fukoidanu

Dotychczas przeprowadzono wiele badań *in vitro*, jak i *in vivo* dotyczących działania przeciwnowotworowego fukoidanu. Okazało się, że może on wywoływać różny efekt w zależności od typu komórki nowotworowej (9, 10). Mechanizm tego działania nie jest do końca wyjaśniony, dlatego poniżej przedstawiono wybrane badania, aby choć w części go przybliżyć.

Jednym z przykładów są badania przeprowadzone na komórkach mięsaka mysiego S-180 *in vivo* i *in vitro* (9). Do testu *in vivo* użyto myszy, którym wprowadzono podskórnie komórki tego nowotworu, a następnie podzielono je losowo na dwie grupy, z których jedna stanowiła grupę kontrolną, a drugiej podawano fukoidan. Po 21-dniowej terapii średnia masa i objętość guza były mniejsze w grupie badanej, w porównaniu z grupą kontrolną. Te wyniki sugerują,

że fukoidan wykazuje działanie przeciwnowotworowe. Jednak naukowcy postanowili potwierdzić wyniki przeprowadzając testy *in vitro*, w których sam fukoidan nie wykazywał hamującego wpływu na komórki S-180. Dopiero w obecności aktywowanych komórek makrofagów RAW 264.7 fukoidan wykazywał działanie przeciwnowotworowe. Postanowiono dokładnie zbadać tę zależność i okazało się, że fukoidan stymuluje komórki RAW 264.7, w wyniku czego zwiększyła się ilość komórek nowotworowych w fazie S i G₂/M, natomiast znacznie spadła liczba komórek w fazie G₁ w stosunku do próby kontrolnej (z niepobudzonymi komórkami RAW 264.7).

Kolejne badania *in vitro* miały na celu określenie wpływu fukoidanu na komórki szpiczaka i chłoniaka linii HS-Sultan (11). Stwierdzono, że fukoidan powodował apoptozę badanych komórek nowotworowych, która była indukowana kaspazą 3 i przemianami mitochondrialnymi. Inhibitor kaspazy zVAD (karbobenzoksy-walyl-alanyl-aspartyl-[O-metyl]-fluorometylketon) sprawił, że apoptoza spowodowana fukoidanem wynosiła tylko 69%, co sugeruje, że przemiany prowadzące do indukcji apoptozy niezwiązane z kaspazą były również w ten proces zaangażowane. Ważną rolę w proliferacji komórek, ich różnicowaniu oraz apoptozie odgrywają kinazy aktywowane miogenami (MAPK), dlatego w dalszej części badań sprawdzono wpływ fukoidanu na fosforylację kinaz regulowanych sygnałami zewnątrzkomórkowymi (ERK) oraz izoformę tego białka biorącego udział w różnicowaniu i apoptozie komórek (p38). Fukoidan widocznie zmniejszał fosforylację kinaz ERK, jednak nie białka p38. Indukował on defosforylację kinazy syntazy glikogenu (GSK) w komórkach HS-Sultan, co sugeruje, że GSK jest związany z apoptozą wywołaną przez ten polisacharyd. Jednak swoisty inhibitor GSK, którym jest chlorek litu, nie zapobiegał apoptozie stymulowanej fukoidanem i aktywacji kaspazy 3, co może oznaczać, że kinaza syntazy glikogenu nie jest konieczna do wywołania apoptozy indukowanej fukoidanem. Potwierdzono również, że fukoidan hamuje namnażanie komórek mięśni gładkich i zmniejsza aktywność kinaz regulowanych sygnałami zewnątrzkomórkowymi. Szlak PI3K/Akt jest najczęstszym mediatorem fosforylacji GSK, ale dowiedziono, że fukoidan nie modyfikował fosforylacji kinazy białkowej w komórkach chłoniaka HS-Sultan. Z tego powodu powinny zostać przeprowadzone dalsze badania, które wyjaśnią, jakie czynniki odpowiadają za fosforylację GSK. Ponadto sprawdzono wpływ fukoidanu na inne sygnałowe szlaki molekularne wywołujące apoptozę, ale polisacharyd ten nie wywoływał zmiany w poziomie białek bcl-2 lub bcl-X_L. Z tego powodu, że bada-

nia przeprowadzano wyłącznie na komórkach HS-Sultan, konieczne są dalsze eksperymenty na innych liniach komórkowych (11).

Działanie apoptotyczne fukoidanu badano również na komórkach ludzkiego raka okrężnicy HCT-15 i uzyskano bardzo podobne wyniki. Stwierdzono, że fukoidan hamuje aktywację szlaku PI3K-kinazy białkowej, fosforylację ERK i p38 oraz aktywuje kaspazę 3 za pośrednictwem kaspazy 9. Zbadano również wpływ fukoidanu na Bcl-2 (heterogenna grupa białek, regulująca uwalnianie cytochromu c i AIF z mitochondriów) i Bax (białko z rodziny białek Bcl-2, przyspiesza apoptozę poprzez tworzenie porów w błonie zewnętrznej mitochondrium, przez co zwiększa jej przepuszczalność). Polisacharyd redukuje poziom Bcl-2 oraz powodował wzrost poziomu Bax w komórkach HCT-15 (7).

W innych badaniach określano wpływ fukoidanu na ludzkie komórki raka płuc A549 (12). Dzięki nim odkryto, że fukoidan hamował wzrost komórek nowotworowych przy stężeniu 400 $\mu\text{g/ml}$, przy czym w niższych stężeniach (200 $\mu\text{g/ml}$) hamował on ich inwazję i migrację. Jednak w jednym, jak i drugim przypadku nie powodował on znaczącego efektu cytotoksycznego. Co więcej, obserwowany spadek migracji i inwazji komórek nie zależał od antyproliferacyjnego działania fukoidanu (12).

Zwiększona aktywność metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej-2 (MMP-2) została odkryta w komórkach nowotworowych raka płuc. Przez to można było przypuszczać, że zatrzymywanie przerzutów przez fukoidan oparte jest na hamowaniu aktywności MMP-2. Badania wykazały, że polisacharyd wpływa raczej na sekrecję lub/i ekspresję MMP-2 niż na jej aktywność (12). Hamowanie przerzutów jest również związane z inaktywacją przez fukoidan szlaku ERK1/2 w ludzkich komórkach raka płuc A549. Oprócz ERK 1/2 również szlak fosfatydyloinozytolu 3-kinazy białkowej (PI3K-Akt) bierze udział w inwazji, przerzutach, rozwoju i przebiegu wielu innych nowotworów. Kilka wcześniejszych badań udowodniło, że szlak sygnałowy PI3K-Akt lub drobnocząsteczkowe inhibitory powodują zmniejszenie ilości tworzenia się guzów w złośliwym raku komórkowym. W trakcie badań odkryto, że fukoidan hamuje fosforylację szlaku PI3K-kinaza białkowa w sposób zależny od czasu i dawki. Fukoidan powoduje zmniejszenie ekspresji MMP-2 przez hamowanie szlaków PI3K oraz mTOR (kinaza białkowa treoninowo-serynowa), tak samo jak szlaku sygnalizującego ERK 1/2 w komórkach ludzkich raka płuc A549.

Oprócz badań opisanych powyżej, przeprowadzono jeszcze wiele innych testów dotyczących właściwo-

ści przeciwnowotworowych fukoidanu. Ustalono, że w warunkach *in vitro* hamował on poliferację oraz indukowaną śmierć komórek chłoniaka. Doniesiono również, że fukoidan hamuje inwazję komórek HT1080 ludzkiego włókniakomięsa oraz neowaskularyzacyjną aktywność komórek HeLa. Natomiast w badaniach *in vivo* fukoidan hamował wzrost raka wsiętkowego Ehrlicha, raka płuc Lewisa, czerniaka B16 oraz hamował przerzuty szurzego gruczolaka sutka 13762 MAT (9).

Właściwości immunostymulujące

Właściwości fukoidanu różnią się w zależności od surowca, z jakiego jest pozyskiwany, dlatego przeprowadzono eksperyment, w którym porównano właściwości fukoidanów z *Undaria pinnatifida* (UP-F) i *Fucus vesiculosus* (FV-F) pod kątem działania immunostymulującego na komórki RAW 264.7 (linia komórkowa makrofagów i monocytów mysiej białaczki), które inkubowano przez 24 godziny z różnymi stężeniami obu fukoidanów (13). Oba związki hamowały wzrost komórek RAW 264.7 w sposób zależny od dawki. Po zestawieniu wyników okazało się, że UP-F wykazał większą wartość IC_{50} (połowa maksymalnego stężenia hamującego), co sugeruje, że jest on mniej cytotoksyczny niż FV-F. Te dwa polisacharydy różniły się także wpływem na TNF- α (czynnik martwicy nowotworu) oraz IL-6 (interleukina 6), a mianowicie UP-F indukował TNF- α , podczas gdy FV-F zmniejszał jego wytwarzanie. Z kolei FV-F powodował zwiększone powstawanie IL-6 w stosunku do UP-F, jednak ten stopniowo zwiększał jej wytwarzanie w sposób zależny od dawki (13).

Kolejnym działaniem fukoidanu, jakie odkryli naukowcy, jest pozytywny wpływ na komórki szpiku kostnego (BMCs) (14). W badaniach wykazano, że fukoidan selektywnie zwiększa przeżycie komórek granulocytów Gr-1+ po ich wcześniejszym napromienianiu, jednak jeszcze nie odkryto mechanizmu, na zasadzie którego ten polisacharyd zwiększa przeżycie akurat tej linii komórkowej. Aby sprawdzić, w jaki sposób fukoidan chroni przed apoptozą komórki BMCs, zbadano poziom cząsteczek biorących udział w procesie apoptozy (Bcl-2, Bcl-X_L oraz Bax, cIAP-1 i cIAP-2). Okazało się, że poziom ekspresji Bcl-2, Bax i cILP-1 był wyższy w komórkach BMCs z fukoidanem niż w próbie kontrolnej, natomiast nie było różnicy w poziomie cILP-2. Białko Bcl-2 wykazuje antyapoptotyczne działanie, z kolei Bax działa przeciwnie do Bcl-2 – działa proapoptotycznie. Jednak w opisywanym badaniu oba białka zostały aktywowane, co sugeruje, że aktywność tych dwóch cząsteczek znosi się wzajemnie. Cząsteczki takie jak cIAP-1 (białko ludzkie kodowane

przez gen *BIRC2*) również mogą wspierać ten proces lub też fukoidan może indukować śmierć jednych komórek oraz zwiększać przeżycie innych komórek BMCs. Dodatkowo BMCs potraktowany fukoidanem wykazuje zwiększoną zdolność, w porównaniu z grupą kontrolną, do stymulacji splenocytów allogenicznych. Zwiększa on wytwarzanie cytokin, ale nie powierzchniowych markerów odpornościowych. Sugeruje się, że zwiększona odpowiedź systemu odpornościowego może być związana ze wzrostem wytwarzania cytokin i zwiększonym odsetkiem komórek Gr-1+, w tym APC wewnątrz komórek stymulatorów (14).

Właściwości przeciwutleniające

Zwłóknieniu wątroby towarzyszy kilka procesów patologicznych, w tym aktywacja komórek gwiaździstych wątroby (HSC), polegająca na przekształceniu się ich w miofibroblasty, a także wydzielanie cytokin prozapalnych oraz zwiększenie odkładania się macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), co w konsekwencji prowadzi do marskości wątroby. Postanowiono zbadać wpływ fukoidanu na ten właśnie proces (15). W tym celu posłużono się szczurami, które podzielono na 4 grupy. Pierwsza grupa była grupą kontrolną, drugiej podawano tylko fukoidan, natomiast w trzeciej i czwartej grupie wywołano zwłóknienie wątroby za pomocą DNM (dimetylonitrozoaminy), przy czym szczurom z ostatniej grupy podawano dodatkowo fukoidan. DNM przyczynia się do wytworzenia reaktywnych form tlenu, które powodują peroksydację lipidów, co w konsekwencji prowadzi do nadmiernego odkładania się włókien kolagenowych w wątrobie. W wyniku tych wszystkich procesów dochodzi do zwłóknienia wątroby (5). Doświadczenie to pokazało, że fukoidan działa przeciwutleniająco poprzez zwiększenie ilości enzymów neutralizujących wolne rodniki, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa i peroksydaza glutationowa, przy jednoczesnym zmniejszeniu wytwarzania aldehydu dimalanowego (MDA) w uszkodzonej wątrobie (15).

Naukowcy zastanawiali się, czy w przeciwutleniającym działaniu fukoidanu na wątrobę nie pośredniczą białka Nrf2 (białko występujące w komórkach, aktywujące geny w warunkach stresu), które odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy procesami oksydacyjno-redukcyjnymi. Białko Nrf2 jest ważnym czynnikiem transkrypcyjnym, który poprzez związanie się z ARE (element odpowiedzi przeciwutleniającej) inicjuje ekspresję genów enzymów o działaniu przeciwutleniającymi takich jak reduktaza NAD(P)H (NQO1), oksigenaza hemowa-1 (HO-1) oraz S-transferaza glutationowa (GST). Zmniejszając one stres oksydacyjny, dzięki czemu odgrywają ważną

rolę w patogenezie wielu chorób wątroby, do których zalicza się m.in. zwłóknienie i stłuszczenie tego narządu (15, 16).

Badania wykazały, że fukoidan zwiększył ekspresję białka Nrf2 i jego późniejsze przemiany oraz zwiększył wytwarzanie mediatorów przeciwutleniających NQO1, HO-1 i GST α u szczurów ze zwłóknieniem wątroby indukowanym DMN (15).

Jak wspomniano wcześniej, fukoidan zmniejsza ilość mediatorów prozapalnych, wśród których znajduje się także TGF- β , aktywujący komórki gwiaździste wątroby. Pośredniczy on w procesie aktywacji ECM oraz indukuje fosforylację czynników transkrypcyjnych Smad 2 i Smad 3 (białka uczestniczące w sygnalizacji komórkowej), natomiast zmniejsza ekspresję Smad 7. Aktywacja Smad 2 i 3 powoduje stymulację syntezy mRNA kolagenu, natomiast aktywacja Smad 7 hamuje ten proces. Czynniki te działają na zasadzie sprzężenia zwrotnego, jednak w przypadku uszkodzenia wątroby równowaga między nimi zostaje zachwiana (15, 16).

Wyniki badań wskazują, że fukoidan regulował profibrotyczne modulatory zwiększające ekspresję Smad 7 oraz zmniejszał wytwarzanie Smad 3 i TGF- β . Doprowadziło to do zahamowania aktywacji HSC i zmniejszenia ilości ECM, a w konsekwencji do zmniejszenia ilości kolagenu w wątrobie, ponieważ aktywne HSC wytwarzają włókna kolagenu typu I, które wchodzi w skład ECM. Dodatkowo w chorobach zwłóknieniowych wątroby obserwuje się zmniejszenie ilości MMP 9 (metaloproteinazy macierzy 9), która jest odpowiedzialna za trawienie ECM i zwiększenie ilości TIMP-1 (tkankowego inhibitora proteinaz 1), hamującego działanie MMP 9. Obecność fukoidanu w organizmie prowadzi do zwiększenia ekspresji MMP 9 i zmniejszenia ekspresji TIMP-1. Na tej podstawie można przyjąć, że ochronne działanie fukoidanu na wątrobę opiera się częściowo na degradacji ECM i obniżeniu ekspresji kolagenu typu I. Tezę tę potwierdza zmniejszona zawartość hydroksyprowliny, która w teście służyła do określenia ilości kolagenu w tkance wątrobowej (15, 16).

Właściwości przeciwzapalne i przeciwbólowe

Stwierdzono, że fukoidan nie wpływa na stężenie w osoczu mediatorów stanu zapalnego, takich jak cytokiny, TNF- α , IL-1 β oraz IL-6. Mimo tego wykazano, że związek ten działa przeciwzapalnie. Podjęto więc próby wyjaśnienia mechanizmów, dzięki którym polisacharyd wykazuje takie działanie (17).

Selektynami nazywana jest grupa białek biorących udział w powstawaniu reakcji zapalnej. Występują

one na powierzchni leukocytów oraz aktywnych komórek śródbłonna i odpowiadają za przemieszczanie się leukocytów do miejsca stanu zapalnego. Przeprowadzone badania wykazały, że gdy do jamy brzusznej szczura, w której wywołano zapalenie otrzewnej, wprowadzono fukoidan w dawce ok. 4 mg/kg, to blokował on L-selektynę i P-selektynę, co w konsekwencji prowadziło do zahamowania przemieszczania się i wynaczyniania neutrofilów w miejscu zapalenia. Działanie to jest spowodowane najprawdopodobniej nie tyle samą budową polisacharydu, a raczej jego strukturą przestrzenną. Słuszność tej teorii może wynikać z faktu, że fukoidan pozyskiwany z różnych brunatnic wykazywał odmienną siłę hamowania aktywności selektyń (5, 8, 18).

Stan zapalny jest ściśle powiązany z bólem, dlatego gdy odkryto hamowanie przez fukoidan reakcji zapalnej, rozpoczęto badania nad jego właściwościami przeciwbólowymi. W celu weryfikacji tej teorii przeprowadzono dwa testy na modelach zwierzęcych: pierwszy, tzw. test wicia się, wywołany przez kwas octowy, oraz drugi – test gorącej płytki. Badania wykazały, że w modelu chemicznie wywołanego bólu, fukoidan znacznie zmniejszał odczucia nocyceptywne, jednak w teście gorącej płytki wyniki nie różniły się znacząco od próby kontrolnej. Może to sugerować, że fukoidan działa przeciwbólowo tylko wtedy, jeśli ból jest pochodzenia obwodowego. Na poparcie tej teorii sformułowano tezę, że ból powstający w wyniku skurczu indukowanego kwasem octowym ma pośredni mechanizm działania – to znaczy, że powoduje uwolnienie endogennych mediatorów, które prowadzą do stymulacji neuronów nocyceptywnych. Wiele z tych mediatorów pochodzi z komórek odpornościowych, które migrują do miejsca zapalenia, takich jak TNF- α , IL-1 β i IL-6. Fukoidan zmniejsza migrację tych mediatorów do stanu zapalnego, zmniejszając tym samym odczyn zapalny, a przy tym dodatkowo wywołując działanie przeciwbólowe (17).

Działanie przeciwzakrzepowe

W celu zbadania zależności pomiędzy przeciwzakrzepowym działaniem glikozaminoglikanów ssaków i fukoidanu porównano wpływ polisacharydów na inaktywację trombiny i czynnik Xa w obecności i nieobecności antytrombiny i kofaktora heparyny II. W zależności od budowy szkieletu i ilości oraz sposobu przyłączenia do niego grup funkcyjnych, w tym wypadku głównie reszt siarczanowych(VI), aktywność przeciwzakrzepowa fukoidanu, pozyskiwanego z różnych rodzajów brunatnic, znacząco różniła się między sobą. Rozgałęzione polisacharydy, które nadają reszty siarczanowe(VI) w pozycji 4-O-, wyka-

zywały większą aktywność przeciwzakrzepową, niż te nierozgałęzione i niemające reszt siarczanowych(VI) w pozycji 4-O-. Rozgałęzione fukoidany bezpośrednio hamują aktywność trombiny, natomiast liniowe dopiero w obecności antytrombiny, bądź kofaktora heparyny II, podobnie jak glikozaminoglikany ssaków (19, 20).

Liniowy i powtarzalny fukan wyekstrahowany z jeżowca *Lytechinus variegatus* wywołuje podobny efekt przeciwzakrzepowy jak siarczan dermatanu, który jest glikozaminoglikanem ssaków. Mimo różnic strukturalnych pomiędzy tymi polisacharydami, oba te związki hamują pośrednio trombinę i wykazują podobną wartość IC₅₀ dla hamowania trombiny w obecności kofaktora heparyny II. Jednak istnieje pewna różnica między działaniem tych dwóch związków, mianowicie siarczan dermatanu nie hamuje trombiny i czynnika Xa w obecności antytrombiny, natomiast związek pozyskiwany z *L. variegatus* wykazuje niewielki wpływ na ten układ (19).

Porównanie dwóch różnych fukoidanów wykazało, że obecność bądź brak jednej z grup siarczanowych(VI) ma istotny wpływ na działanie przeciwzakrzepowe. Przypuszcza się, że dodatkowa grupa siarczanowa(VI), którą zawiera polisacharyd pozyskiwany z *L. variegatus*, umożliwia ułożenie przestrzenne łańcucha fukoidanu tak, że naśladuje on ten fragment siarczanu dermatanu, który wykazuje wysokie powinowactwo do kofaktora heparyny II. Jest to dość skomplikowana struktura, wymagająca swoistej sekwencji, w której znajdują się reszty siarczanowe(VI) przyłączone wiązaniem 4-O- do głównego łańcucha. Jeśli w fukoidanie te reszty przyłączone są w sposób 4-O- i przeplatają się z tymi połączonymi w pozycji 2-O-, to ten związek wykazuje również działanie przeciwzakrzepowe, jednak wiązań 4-O- powinno być więcej niż tych 2-O- (19, 21). Jeśli polisacharyd ma reszty siarczanowe(VI) przyłączone do głównego łańcucha tylko za pomocą wiązań 2-O-, to taki związek nie wykazuje działania przeciwzakrzepowego (19, 21).

Działanie przeciwbakteryjne

Badania dotyczące działania przeciwbakteryjnego fukoidanu zostały przeprowadzone na samcach myszokoczków mongolskich z użyciem fukoidanu otrzymanego z *Cladosiphon okamuranus*, ponieważ *in vivo* nie wywoływał on zmian w jelicie grubym, jak i innych narządach, a w teście *in vitro* wykazywał zdolność wiązania się z mucyną świńskiego żołądka w środowisku kwasowym. W badaniach *in vitro* jeszcze dwa inne polisacharydy (sól sodowa siarczanu dekstranu i fukoidan otrzymany z *Fucus vesiculosus*)

hamowały wiązanie się pałeczek *Helicobacter pylori* do mucyny świńskiego żołądka, jednak *in vivo* wykazywały one negatywny wpływ na narządy (22).

Samce myszokoczków mongolskich podzielono na trzy grupy. Grupa kontrolna nie została zakażona, pozostałym dwóm grupom wprowadzono przez zgłębnik bakterie *H. pylori*. Jedna z zakażonych grup otrzymywała wodę z fukoidanem przez trzy dni przed wprowadzeniem do organizmu bakterii, druga grupa otrzymała wodę zawierającą fukoidan dopiero dwa tygodnie po zakażeniu. Następnie po sześciu tygodniach wszystkie zwierzęta zostały zabite, a ich żołądki poddano analizie (22).

Uważa się, że fukoidan przytwierdza się do powierzchni bakterii, przez co działa konkurencyjnie w stosunku do mucyny. Z tego powodu w żołądkach drugiej grupy zwierząt, która otrzymała fukoidan przed wprowadzeniem bakterii, zaobserwowano mniej zaznaczone zmiany w błonie żołądka. Jednak w organach zwierząt, które otrzymały fukoidan dopiero po wprowadzeniu do żołądka bakterii, nie zaobserwowano widocznego spadku liczby *H. pylori*, jak również mniej zaznaczonego stanu zapalnego żołądka. Wyniki te sugerują, że potencjał fukoidanu z *Cladosiphon okamuranus* jako czynnika eliminującego *H. pylori* jest słaby (22).

Działanie przeciwwirusowe

Jedno z badań dotyczących przeciwwirusowych właściwości fukoidanu przeprowadzono na pacjentach z wirusowym zapaleniem wątroby typu C (HCV) i związaną z tym marskością wątroby, którzy nie zareagowali pozytywnie na leczenie interferonem. Fukoidan okazał się skuteczny w obniżaniu poziomu RNA wirusa, chociaż jego działanie było przejściowe – zmniejszoną ilość RNA zaobserwowano w 8., 9. i 10. miesiącu kuracji, natomiast w 12. miesiącu poziom RNA wirusa wrócił do wartości pierwotnej. Sprawdzano również wpływ fukoidanu na interferon. Nie zaobserwowano jednak ani zwiększonej aktywności interferonu, ani jego zwiększonej ekspresji. Naukowcy są zdania, że powodem tego mogła być zbyt mała liczba pacjentów, jak i to, że niektórzy z nich nie reagowali na leczenie interferonem, co mogło osłabić działanie fukoidanu (23).

Wiele eksperymentów dotyczyło również wpływu fukoidanu na wirusa HIV-1 (ludzki wirus niedoboru odporności 1). Badania te sugerują dwojaki mechanizm działania tego związku. Przyłącza się on do białka CD4+ na komórkach gospodarza (limfocyty T pomocnicze), uniemożliwiając ich zakażenie wirusem HIV-1, lub też wiąże się on z glikoproteinami na otoczce wirusa, co zapobiega jego adsorpcji na

powierzchni komórki gospodarza i wprowadzeniu do niej wirusa (24, 25).

Inne właściwości

Na uwagę zasługuje też możliwość wykorzystania fukoidanu jako związku o działaniu opóźniającym starzenie się i ułatwiającym gojenie ran. Odpowiedzialne za to są oczywiście opisane właściwości przeciwutleniające, ale też zdolność fukoidanu do stymulacji w ludzkiej skórze integryn $\alpha 2$ i $\beta 1$ oraz fibroblastów do tworzenia kolagenu (26).

Podsumowanie

Organizmy morskie są ciągle słabo zbadanym źródłem substancji o ogromnym potencjale biologicznym. Jedną z interesujących substancji, obecnie szczególnie badanych, jest polisacharyd fukoidan, zbudowany z cząsteczek α -L-fukopiranozy, które mogą być ze sobą połączone za pomocą wiązań 1→3 lub wiązań 1→3 i 1→4 występujących na przemian. Rozgałęzioną strukturę fukoidan zawdzięcza przyłączeniu do głównego łańcucha reszt α -L-fukopiranozy, a także podstawników nieorganicznych – reszty siarczanowe(VI), oraz organicznych takich jak kwas D-glukuronowy i reszty acetylowe. Dla potrzeb farmaceutycznych fukoidan otrzymywany jest z brunatnic, przede wszystkim z różnych gatunków morskoczynów i z tkanek bezkręgowców morskich – szkarłupni.

Związek ten wykazuje aktywność przeciwutleniającą, immunostymulującą, przeciwnowotworową, przeciwzapalną, przeciwbakteryjną, przeciwwirusową i przeciwzakrzepową. Jednak w zależności od organizmów, z jakich pozyskiwany jest fukoidan, różnią się nieznacznie budową chemiczną oraz siłą i profilem działania. Fukoidan, a właściwie jego liczne pochodne, stanowią grupę związków o dużym potencjale farmakologicznym. Na rynku polskim są już obecne preparaty zawierające te związki, przykładem może być preparat Fucoidan 70% (kapsułki zawierające 300 mg substancji biologicznie aktywnej). Preparat ten rekomendowany jest jako usprawniający pracę układu immunologicznego. Stąd celowe wydaje się poznanie i uzyskanie informacji na temat nowych substancji o potencjale leczniczym, w tym substancji pochodzących z organizmów morskich.

Piśmiennictwo

1. Solomon P, Wasser SP, Weis A. Therapeutic effects of substances occurring in higher *Basidiomycetes* mushroom: a modern perspective. *Critical Rev Immunol* 1999; 19:65-9.
2. Sułkowska-Ziaja K, Muszyńska B, Końska G. Biologically active compounds of fungal origin displaying antitumor activity. *Acta Pol Pharm – Drug Res* 2005; 62:153-60.
3. Szweykowska A, Szweykowski J. *Botanika*. T. 2. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2012.
4. Matławska I. (red.). *Farmakognozja*. Wyd. AM, Poznań 2008.
5. Cumashi A,

- Ushakova NA, Perobrazhenskaya ME i wsp. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiol* 2007; 17:541-52. **6.** Patankar MS, Oehninges S, Barnett T i wsp. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J Biol Chem* 1993; 268:21770-6. **7.** Hyun JH, Kim S, Kang JI i wsp. Apoptosis inducing activity of fucoidan in HCT-15 colon carcinoma cells. *Biol Pharm Bull* 2009; 3:1760-4. **8.** Fitton JH. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Marine Drugs* 2011; 9:1731-60. **9.** Takeda K, Tomimori K, Kimura R i wsp. Anti-tumor activity of fucoidan is mediated by nitric oxide released from macrophages. *Int J Oncol* 2012; 40:251-60. **10.** Wu XZ, Chen D. Effects of sulfated polysaccharides on tumour biology. *West Indian Med J* 2006; 55:270-3. **11.** Asia Y, Miyakawa Y, Nakazato T i wsp. Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *Am J Hematol* 2005; 78:7-14. **12.** Lee H, Kim JS, Kim E. Fucoidan from seaweed *Fucus vesiculosus* inhibits migration and invasion of human lung cancer cell via PI3K-Akt-mTOR pathways. *Plos One* 2012; 7:506-24. **13.** Yoo Y, Kim WJ, Kim SY i wsp. Immunomodulating activity of fucoidan isolated from Korean *Undaria pinnatifida* sporophyll. *Algae* 2007; 22:333-8. **14.** Byon YY, Kim MH, Yoo ES i wsp. Radioprotective effects of fucoidan on bone marrow cell: improvement of the cell survival and immunoreactivity. *J Vet Sci* 2008; 9:359-65. **15.** Hong SW, Jung KH, Lee HS i wsp. Suppression by fucoidan of liver fibrogenesis via the TGF- β /Smad pathway in protection against oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; 75:833-40. **16.** Plewka K, Szuster-Ciesielska A, Kandefers-Szerszeń M. Rola komórek gwiaździstych w procesie alkoholowego włóknienia wątroby. *Post Hig Med Dośw* 2009; 63:303-17. **17.** Albuquerque IR, Corderio SL, Gomes DL i wsp. Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of heterofucan from *Dictyota menstrualis*. *Marine Drugs* 2013; 11:2722-40. **18.** Brandt CT, Lundgren JD, Lund SP i wsp. Pretreatment with fucoidan promotes lethal infection in a rat model of experimental pneumococcal meningitis. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (43rd). Chicago. **19.** Pereira MS, Mulloy B, Mourão PAS. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans: comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from *Echinoderms* with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J Biol Chem* 1999; 274:7656-67. **20.** Deux JF, Meddahi-Pellé A, Le Blanche AF i wsp. Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arterioscler Thrombos, Vasc Biol* 2002; 22:1604-9. **21.** Pereira MS, Melo FR, Mourão PAS. Is there a correlation between structure and anticoagulant action sulfated galactans and sulfated fucans? *Glycobiol* 2002; 12:573-80. **22.** Shibata H, Iimuro M, Uchiya N i wsp. Preventive effects of *Cladosiphon* fucoidan against *Helicobacter pylori* infection Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2003; 8:59-65. **23.** Mori N, Nakasone K, Tomimori K i wsp. Beneficial effects of fucoidan in patients with chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2012; 18:2225-30. **24.** Pearce-Pratt R, Phillips DM. Sulfated polysaccharides inhibit lymphocyte-to-epithelial transmission of human immunodeficiency virus-1. *Biol Reprod* 1996; 54:173-82. **25.** Irhimeh MR, Fitton JH, Lowenthal RM. Fucoidan ingestion increases the expression of CXCR4 on human CD34+ cells. *Exp Hematol* 2007; 35:989-94. **26.** Fujimura T, Tsukahaara K, Moriwaki S i wsp. Treatment of human skin with an extract of *Fucus vesiculosus* changes its thickness and mechanical properties. *J Cosmet Sci* 2002; 53:1-9.

otrzymano/received: 03.10.2015
zaakceptowano/accepted: 14.10.2015

Adres/address:
*Bożena Muszyńska
Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej,
Wydział Farmaceutyczny, UJ CM
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków
tel./fax +48 (12) 620-54-30
e-mail: muchon@poczta.fm