

УДК 577.114.15.593.95

ВЛИЯНИЕ ФЛОРЕТОЛА БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *COSTARIA COSTATA* (TURN.) SAUND (ОТРЯД LAMINARIALES) НА ГАМЕТЫ И ЭМБРИОГЕНЕЗ МОРСКОГО ЕЖА *STRONGYLOCENTROTUS INTERMEDIUS* (A. AGASSIZ, 1864)

© 2024 г. М. И. Киселева¹, * (ORCID: 0009-0000-5816-5500),
Т. И. Имбс¹, И. Ю. Бакунина¹ (ORCID: 0000-0003-4039-5927)

¹Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова (ТИБОХ) ДВО РАН,
Владивосток 690022, Россия
*e-mail: mikiseleva@mail.ru

Поступила в редакцию 22.12.2023 г.
После доработки 07.06.2024 г.
Принята к публикации 10.06.2024 г.

Изучено влияние фракции флоретол (CcPh), одного из полифенольных соединений, выделенных из бурой водоросли *Costaria costata* (Turn.) Saund (отряд Laminariales), на гаметы и эмбриогенез морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* (A. Agassiz, 1864). На модели развивающихся эмбрионов морского ежа показано, что флоретол в концентрациях ≤ 700 мкг/мл не оказывал цитотоксического действия на ранних стадиях развития (от зиготы до стадии 16 бластомеров). Эмбриотоксическое влияние флоретол, вызывающее гибель 50% эмбрионов, проявлялось в диапазоне концентраций (I) $50 < I \leq 100$ мкг/мл только через 24 ч инкубации, на стадии бластулы. При его действии в концентрациях ≥ 100 мкг/мл эмбрионы, дожившие до стадии бластулы, дальше не развивались и погибали через 36 ч инкубации. Под влиянием флоретол у сперматозоидов и яйцеклеток морского ежа снижалась способность к оплодотворению. Концентрация флоретол, ингибирующая оплодотворение на 50% (ИК₅₀) при действии на спермии составляла 1.28 ± 0.38 мкг/мл, при действии на яйцеклетки — 3.83 ± 0.82 мкг/мл. Таким образом, флоретол снижает способность гамет морского ежа к оплодотворению в концентрациях, намного ниже эмбриотоксических, и, возможно, обладает потенциалом практического применения в составе новых контрацептивных препаратов для млекопитающих и человека.

Ключевые слова: бурые водоросли, *Costaria costata*, эмбрионы, спермии, яйцеклетки, морской еж, *Strongylocentrotus intermedius*, флоретол, полифенолы

DOI: 10.31857/S0134347524050068

Бурые водоросли синтезируют полифенольные соединения, которые проявляют широкий спектр биологической активности и действуют в малых концентрациях (Имбс, Звягинцева, 2018). Флоротаннины — основные полифенольные соединения бурых водорослей. Мономерной единицей флоротаннинов является флороглюцин (1,3,5-тригидроксibenзол). По типу связи между мономерами флоротаннины можно разделить на четыре класса: фугалолы и флоретолы (эфирная связь), фуколы (фенильная связь), фукофлоретолы (эфирная и фенильная связи), эколы и кармалолы

(дибензодиоксиновая связь). Внутри каждого класса связывание мономеров друг с другом может происходить в разных положениях флороглюцинового кольца, что приводит к образованию и структурных, и конформационных изомеров. Показано, что один вид водорослей может продуцировать флоротаннины разной структуры и разной степени полимеризации (Имбс, Звягинцева, 2018).

Ранее показано, что фракция флоретол, выделенная из бурой водоросли *Costaria costata* (Turn.) Saund (отряд Laminariales), ингибирует

действие ферментов морских бактерий, разрушающих фукоидан (Silchenko et al., 2017; Imbs et al., 2018), снижает биосинтез иммунодепрессивного фермента α -N-ацетилгалактозаминидазы в клеточных линиях аденокарциномы двенадцатиперстной кишки HuTu 80 и меланомы SK-MEL-28, а также необратимо ингибирует эти ферменты, выделенные из культуры клеток, связываясь в их активном центре (Bakunina et al., 2023).

Морские ежи (тип Echinodermata, класс Echinoidea) широко распространены в Мировом океане. Известно около 900 видов этих беспозвоночных. Обитающий у побережья Приморского края морской еж *Strongylocentrotus intermedius* — один из 20 видов, известных в морях России. Гаметы и эмбрионы морского ежа — это удобная и чувствительная модель для токсикологических, фармакологических и других биологических исследований. Это обусловлено возможностью проведения искусственного оплодотворения и наличием быстрого синхронного развития эмбрионов, которые обладают оптической прозрачностью и хорошей проницаемостью для многих соединений (Бузников, Подмарев, 1975; Анисимов и др., 1995; Киселева и др., 2015; Kobayashi, 1984).

Целью настоящей работы стало изучение влияния полифенольного соединения флоретол бурой водоросли *C. costata* на гаметы и эмбриогенез морского ежа *S. intermedius*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В эксперименте использовали фракцию полифенольных соединений, выделенную ранее (Imbs et al., 2018) из водно-этанольного экстракта бурой водоросли *Costaria costata*, собранной в б. Троицы, зал. Петра Великого Японского моря. Фракция полифенолов была очищена с использованием жидкостной экстракции органическими растворителями и хроматографией на носителях: силикагель 100, полихром 1 и силикагель С-18, и охарактеризована методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения как флоретол (C₂₈H₂₄O₁₀) с молекулярной массой 1490–3102 Da.

Биологические эксперименты проводили на морской экспериментальной станции Тихоокеанского института биоорганической химии

им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (Хасанский район, Приморский край, Россия). Морских ежей собирали в сентябре-октябре в б. Троицы, зал. Петра Великого Японского моря.

Выделение половых продуктов и оплодотворение морского ежа

Нерест особей морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* провоцировали механическим встряхиванием. Сперму и яйцеклетки собирали в разные емкости с фильтрованной морской водой. Яйцеклетки пропускали через мельничный газ (размер ячеек 100×100 мкм) и дважды промывали морской водой. Оплодотворение проводили в соответствии с известными методиками (Бузников, Подмарев, 1975; Киселева и др., 2015, 2021) с некоторыми модификациями. В экспериментах использовали яйцеклетки со степенью оплодотворения не менее 98%. Время от получения яйцеклеток до их оплодотворения не превышало 1 ч. Все опыты проводили одновременно в 12-луночных планшетах компании ООО “БиолоТ” (Россия) при температуре 20.0±0.5°C на одних и тех же партиях эмбрионов в каждом эксперименте, используя стандартный протокол ОСС-биотеста (Диннел, 1995; Lera et al., 2006).

Влияние флоретол на эмбриогенез морского ежа

Для изучения эмбриотоксической активности флоретол использовали оплодотворенные яйцеклетки (зиготы) морского ежа *S. intermedius*. Флоретол добавляли в инкубационную смесь через 3–5 мин после оплодотворения яйцеклеток. Инкубационная смесь содержала: 0.1 мл флоретол и 0.9 мл суспензии оплодотворенных яйцеклеток (2.5×10^3 /мл) в морской воде. Конечная концентрация флоретол в инкубационной смеси составляла 10, 50, 100, 500 и 700 мкг/мл. В качестве контроля использовали эмбрионы в морской воде, которые инкубировали в течение 84 ч до стадий среднего плутуса 1 и 2 (стадии 25 и 26 — здесь и далее в скобках курсивом обозначены стадии развития по: Бузников, Подмарев, 1975). В инкубационной смеси с разной концентрацией флоретол эмбрионы выдерживали до их гибели. За влиянием флоретол на развивающиеся эмбрионы наблюдали в микроскоп “Motic AE 21” (КНР)

и визуально определяли основные признаки и стадии (Бужников, Подмарев, 1975). Стандартными критериями для положительной оценки действия флоретолы были синхронность деления бластомеров, нормальное функционирование и жизнеспособность эмбрионов. При этом регистрировали такие нарушения, как лизис бластомеров, аномалии и отставание в развитии эмбрионов (Kobayashi, 1984; Kobayashi, Okamura, 2002), а также определяли интервал концентраций, вызывающий гибель 50% эмбрионов ($ИК_{50}$). Жизнеспособность эмбрионов оценивали как отношение времени их жизни под действием разных концентраций флоретолы (ч) ко времени жизни в контрольном эксперименте (ч). Эксперименты действия флоретолы в разных концентрациях выполняли одновременно, в одинаковых условиях с использованием одной партии эмбрионов в каждом из 3–5 параллельных опытов с тремя повторами для каждой концентрации вещества.

Влияние флоретолы на гаметы морского ежа

Для определения способности гамет морского ежа к оплодотворению после действия на них флоретолом СсPh сперматозоиды (1.5×10^7 /мл) или зрелые яйцеклетки (2.5×10^3 мл) выдерживали в фильтрованной морской воде в течение 30 мин с разными концентрациями СсPh (0.5–15.0 мкг/мл). Затем к 0.9 мл суспензии спермиев с флоретолом добавляли 0.1 мл интактных яйцеклеток (2.5×10^4 /мл), к 0.9 мл суспензии неоплодотворенных яйцеклеток с флоретолом добавляли 0.1 мл спермиев (1.5×10^8 /мл). Обе суспензии инкубировали 30 мин. В каждом варианте эксперимента количество оплодотворенных яйцеклеток считали с помощью инвертированного микроскопа “Motic AE 21” (КНР) в камере Горяева в пяти полях зрения, затем определяли долю оплодотворенных яйцеклеток от их общего числа. Концентрацию соединений, при которой наблюдали 50% ($ИК_{50}$) и 100% ($ИК_{100}$) ингибирование оплодотворения, определяли из графика зависимости доли оплодотворенных яйцеклеток от концентрации СсPh. В работе представлены результаты, полученные из трех независимых экспериментов с тремя повторами для каждой концентрации флоретолы (Киселева и др., 2015).

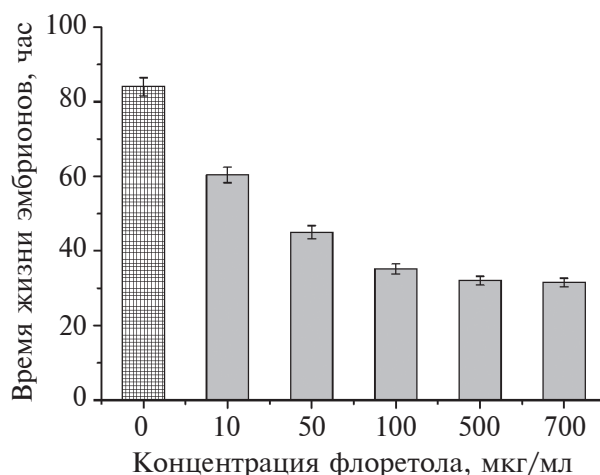


Рис. 1. Влияние разных концентраций флоретолы бурой водоросли *Costaria costata* на жизнеспособность эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*: средние значения времени жизни эмбрионов $\pm$ среднеквадратичная ошибка (вертикальные линии) при доверительной вероятности $p \leq 0.05$.

Достоверность результатов оценивали с помощью статистических программ дисперсионного анализа ANOVA к необработанным данным в пакете прикладных программ Origin 8.1 (“OriginLab”, США). Уровень значимости в каждом случае составлял $p \leq 0.05$; медианные эффективные концентрации ($ИК_{50}$) со стандартным отклонением рассчитывали путем аппроксимации кривых “доз-зависимости” по методу нелинейной регрессии в том же пакете программ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цито- и эмбриотоксическое действие флоретолы

Согласно результатам экспериментов (табл. 1), на ранних стадиях развития (от зиготы до стадии 16 бластомеров) флоретол СсPh во всех испытанных концентрациях не оказывал цитотоксического действия. Присутствие в инкубационной среде СсPh в концентрациях 10–100 мкг/мл не влияло на развитие эмбрионов в течение 8 ч, до стадии ранней бластулы (стадии 8–9) (табл. 1). Увеличение концентрации СсPh до 500 мкг/мл уже через 2 ч инкубации вызывало асинхронное деление бластомеров, через 8 ч возникали аномалии, а перед вылуплением, на стадии ранней бластулы, наблюдалась 50% гибель эмбрионов. Эмбриотоксическое действие флоретолы

Таблица 1. Влияние флоретола бурой водоросли *Costaria costata* (CcPh) на развивающиеся эмбрионы морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*

Доза CcPh, мкг/мл	Время инкубации после оплодотворения, ч						
	2.0	8.0	12.0	24.0	36.0	48.0	84.0
Стадии развития							
00, контроль	3–4	9	10 < 11, вылупление	15–16	22–24	23–24	25–26
10	3–4	8–9	10 < 11	15–16, Г 30%	22–24, Г 30%	22–24, ан., Г 30%	Г
50	3–4	8–9	9–10	9–10, Г 30%	10–12, ан., Г 30%	15, ан., Г 50%, Л 10%	Г
100	3–4	8–9	9–10	9–10, Г 50%	Г, Л	–	–
500–700*	1–4	1–9, ан.	8–9, ан., Г 50%	9–10, ан., Г 50%	Г, Л	–	–

*В этом диапазоне концентраций результаты влияния флоретола были одинаковыми.

Примечание. Действие флоретола в концентрации выше 700 мкг/мл не исследовали. Контроль – развитие эмбрионов в морской воде. Стадии развития: 1 и 2 – появляется оболочка оплодотворения; 3 и 4 – 2 и 4 blastomeres соответственно; 5, 6 и 7 – 8, 16 и 32 blastomeres соответственно; 8 и 9 – ранняя blastula 1 и 2 соответственно; 10 и 11 – средняя blastula 1 и 2 (вылупление) соответственно; 12 и 13 – поздняя blastula 1 и 2 соответственно; 14 и 15 – ранняя gastrula 1 и 2 соответственно; 16 – средняя gastrula 1; 22, 23 и 24 – ранний pluteus 1, 2 и 3 соответственно; 25 и 26 – средний pluteus 1 и 2 соответственно (по: Бузников, Подмарев, 1975); плотность клеток в инкубационной среде 2500 кл/мл. Условные обозначения: Г – гибель эмбрионов; Л – лизис эмбрионов; ан. – аномальное развитие эмбрионов; “–” – эксперимент завершен, все эмбрионы погибли. В таблице приведены данные трех экспериментов, доверительный интервал $p \leq 0.05$.

в концентрациях 10–100 мкг/мл появлялось только через 24 ч инкубации, на стадии blastula, когда в зависимости от концентрации отмечалось заметное отставание в развитии и гибель 30–50% эмбрионов (табл. 1). Оставшиеся в живых эмбрионы после инкубации с флоретолом в концентрациях ≥ 100 мкг/мл, дальше не развивались и через 36 ч инкубации погибали, оставаясь на стадии blastula. В контроле эмбрионы через 36 ч инкубации достигали стадии раннего pluteus (стадии 22–24) (табл. 1). Через 48 ч инкубации при концентрации флоретола 50 мкг/мл наблюдали заметное отставание в развитии (стадия 15), появление множества аномалий и 50% гибель эмбрионов. Изменение времени жизни развивающихся эмбрионов морского ежа в зависимости от исследуемых концентраций флоретола по сравнению с контролем представлено на рис. 1. Продолжительность жизни эмбрионов в контроле, которую принимали за 100%, составила 84 ч (табл. 1, рис. 1).

В течение эксперимента установлено, что эмбриотоксическое действие флоретола в зависимости от его концентрации проявлялось в разное время, при этом концентрация флоретола, снижающая продолжительность жизни

эмбрионов на 50% (ИК₅₀) была $50 < I \leq 100$ мкг/мл (рис. 1). Присутствие в инкубационной среде флоретола в концентрации 50 мкг/мл также приводило к появлению аномальных эмбрионов и гибели, но на стадии gastrula, после 36–48 ч инкубации. В контроле за это время эмбрионы достигли стадии pluteus. Самая низкая из испытанных концентраций флоретола – 10 мкг/мл не оказывала влияния на стадии развития, но вызывала гибель 30% эмбрионов через 24 ч инкубации и более раннюю гибель всех эмбрионов по сравнению с контролем (табл. 1, рис. 1).

Влияние флоретола на гаметы морского ежа

На основе экспериментов по влиянию флоретола на гаметы морского ежа построены графики эффективности оплодотворения *S. intermedius* в (рис. 2) зависимости от концентрации флоретола при действии на сперматозоиды (1) и яйцеклетки (2). Анализ сигмоидальных кривых с помощью уравнения Хилла позволил определить значения констант ингибирования оплодотворения (ИК₅₀), которые после действия флоретола на спермии оказались в 3 раза ниже, чем после действия этого

вещества на яйцеклетки, и составили 1.28 ± 0.38 и 3.83 ± 0.82 мкг/мл соответственно. Минимально эффективные дозы СсРф, вызывающие 100% ингибирование оплодотворения (ИК₁₀₀), при действии на спермии составили 7.8 ± 0.2 мкг/мл, а на яйцеклетки — 12.7 ± 0.2 мкг/мл (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрического анализа флоротаннины бурой водоросли *Costaria costata* представляют собой высокомолекулярную фракцию флоретолов (СсРф) со степенью полимеризации (СП), равной 11–25 единиц флороглюцина. Ранее было показано, что СсРф ингибировал действие фукоидан-гидролаз морских организмов (Imbs et al., 2018); в нетоксичных концентрациях ингибировал образование колоний в клетках рака толстой кишки человека НСТ 116 и НТ-29 и значительно повышал их чувствительность к низкотоксичному рентгеновскому облучению (Malyarenko et al., 2020).

Цитотоксические и ингибирующие свойства фракции СсРф исследованы на гаметах и развивающихся эмбрионах морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. В отличие от низкомолекулярной фракции фукофлоретолов FeРф (СП = 3) из бурой водоросли *Fucus evanescens*, которая в концентрациях ≥ 50 мкг/мл проявляла ярко выраженное цитотоксическое действие на ранних стадиях, ингибируя деление яйцеклеток (Киселева и др., 2021), флоретол СсРф, добавленный на стадии зиготы, во всех исследованных концентрациях не оказывал цитотоксического действия на оплодотворенные яйцеклетки морского ежа. На развитие эмбрионов СсРф в концентрациях 10–100 мкг/мл, добавленный к оплодотворенным яйцеклеткам, не влиял в течение 8 ч инкубации, до стадии ранней бластулы (стадии 8–9). Его действие проявлялось только на стадии бластулы, через 24 ч инкубации. Эмбриотоксическое действие флоретолов СсРф развивалось постепенно, в течение всего инкубационного периода, вызывая отставание в развитии, аномалии и гибель эмбрионов. Это отличает флоретол от обладающих ярко выраженным цитотоксическим действием тритерпеновых и стероидных гликозидов, которые блокировали дробление и

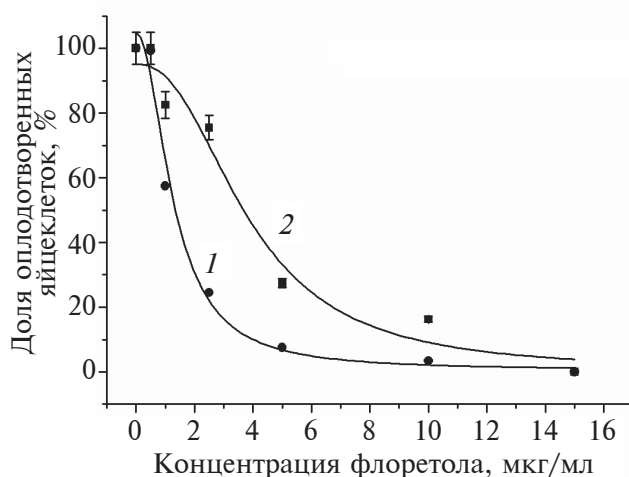


Рис. 2. Эффективность оплодотворения морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* в зависимости от концентраций флоретолов бурой водоросли *Costaria costata*, использованных при обработке сперматозоидов (1) и яйцеклеток (2).

вызывали лизис зигот (Анисимов и др., 1995; Прокофьева и др., 2002; Prokof'eva et al., 2003).

Эмбриотоксическое действие флоретолов СсРф зависело от концентрации и времени инкубации оплодотворенных яйцеклеток, чем выше была концентрация вещества, тем раньше наступала гибель эмбрионов. В концентрациях ≤ 100 мкг/мл действие СсРф проявлялось только через 36 ч инкубации, после вылупления эмбрионов на стадии бластулы. В контроле за это время эмбрионы развивались до стадии среднего плутеуса (табл. 1). Подобным образом влияли на эмбриогенез такие фенольные соединения, как эхинохром — пигмент морского ежа *Echinothrix diadema* и производные нафтазарина (Похило и др., 2008, 2011; Pokhilo et al., 2015).

Было исследовано действие флоретолов СсРф на гаметы морского ежа и их способность к оплодотворению. Известно, что яйцеклетки морского ежа не чувствительны к большинству токсинов (Диннел, 1995). Флоретол СсРф, как и ранее изученный фукофлоретол FeРф (Киселева и др., 2021), подавлял способность гамет морского ежа к оплодотворению, при этом спермии были более чувствительны, чем яйцеклетки. ИК₅₀ СсРф после обработки спермиев составила 1.28 ± 0.38 мкг/мл, а после действия на яйцеклетки в три раза больше — 3.83 ± 0.82 мкг/мл (рис. 2). Следует отметить, что ИК₅₀ СсРф при

воздействию на гаметы морского ежа была значительно ниже, чем его концентрации, влияющие на жизнеспособность эмбрионов ($50 < I \leq 100$ мкг/мл).

Таким образом, флоретол из *C. costata* не только эффективно подавляет ферменты из раковых клеток, но и ингибирует оплодотворение яйцеклеток морского ежа, демонстрируя при этом низкое цитотоксическое действие. Соединение, блокирующее взаимодействие сперматозоидов и яйцеклеток в дозах, которые намного ниже цитотоксических, возможно, имеет потенциал практического применения в составе новых контрацептивных препаратов для млекопитающих и человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Еякова ДВО РАН. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с морским ежом проводились в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анисимов М.М., Лихацкая Г.Н., Шенцова Е.Б. и др. Использование яйцеклеток и эмбрионов морского ежа для биотестирования и изучения связи структура – активность природных и синтетических биологически активных соединений // Биол. моря. 1995. Т. 21. № 6. С. 417–420.
- Бузников Г.А., Подмарев В.К. Морские ежи *Strongylocentrotus droebachiensis*, *St. nudus*, *St. intermedius*. Методы биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 188–222.
- Диннел П.А. Эволюция и современный статус биотеста, основанного на оценке оплодотворяющей способности сперматозоидов морского ежа (Sea urchin sperm test) // Биол. моря. 1995. Т. 21. № 6. С. 390–397.
- Имбс Т.И., Звягинцева Т.Н. Флоротаннины – полифенольные метаболиты бурых водорослей // Биол. моря. 2018. Т. 44. № 4. С. 217–227.
- Киселева М.И., Ермакова С.П., Звягинцева Т.Н. Действие белков и полисахаридов бурых водорослей на оплодотворение яйцеклеток и развитие эмбрионов морского ежа *Strongylocentrotus intermedius*. А. Agassiz, 1863² // Биол. моря. 2015. Т. 41. № 6. С. 437–446.
- Киселева М.И., Имбс Т.И., Авиллов С.А., Бакунина И.Ю. Влияние полифенольных примесей, содержащихся в образцах фукоидана из бурой водоросли *Fucus distichus* subsp. *evanescens* (С. Agardh) Н.Т. Powell, 1957, на эмбриогенез морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* (А. Agassiz, 1864) и эмбриотоксическое действие кукумариозида // Биол. моря. 2021. Т. 47. № 4. С. 290–299. <https://doi.org/10.31857/S0134347521040070>
- Похило Н.Д., Киселева М.И., Маханьков В.В., Ануфриев В.Ф. Цитотоксическая активность полупродуктов и побочных продуктов синтеза эхинохрома // Химия природ. соедин. 2008. № 3. С. 428–231.
- Похило Н.Д., Киселева М.И., Ануфриев В.Ф. Синтез и цитотоксическая активность азидонафтазариннов // Хим.–фарм. журн. 2011. Т. 45. № 9. С. 77–81.
- Прокофьева Н.Г., Анисимов М.М., Киселева М.И. и др. Цитотоксическое действие даммарановых три-терпеноидов, выделенных из листьев берез // Изв. АН. Сер. биол. 2002. С. 645–649.
- Bakunina I., Imbs T., Likhatskaya G. et al. Effect of phlorotannins from brown algae *Costaria costata* on α -N-acetylgalactosaminidase produced by duodenal adenocarcinoma and melanoma cells // Mar. Drugs. 2023. V. 21. № 1. P. 33–51. <https://doi.org/10.3390/md21010033>
- Imbs T.I., Silchenko A.S., Fedoreev S.A. et al. Fucoidanase inhibitory activity of phlorotannins from brown algae // Algal Res. 2018. V. 32. № 1. P. 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.009>
- Kobayashi N. Marine ecotoxicological testing with echinoderms // Ecotoxicological Testing for the Marine Environment: Proc. Int. Symp. (Ghent, Belgium, September 12–14, 1983), Belgium: State Univ. of Ghent. 1984. V. 1. P. 341–405.
- Kobayashi N., Okamura H. Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin // Mar. Pollut. Bull. 2002. V. 44. № 8. P. 748–751. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00052-8](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00052-8)

- Lera S., Macchia S., Pellegrini D. Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus* // Environ. Monit. Assess. 2006. V. 122. P. 101–109.
https://doi.org/10.1007/s10661-0059167-4
- Malyarenko O.S., Imbs T.I., Ermakova S.P. In vitro anticancer and radiosensitizing activities of phlorethols from the brown alga *Costaria costata* // Molecules. 2020. V. 25. № 14. Art. ID 3208.
https://doi.org/10.3390/molecules25143208
- Pokhilo N.D., Melman G.I., Kiseleva M.I. et al. Synthesis, cytotoxic and contraceptive activity of 6,8,9-Trihydroxy-2-methyl-2H-naphtho[2,3-b]pyran-5,10-dione, a Pigment of *Echinothrix diadema*, and its Analogs // Nat. Prod. Commun. 2015. V. 10. № 7. P. 1243–1246.
https://doi.org/10.1177/1934578X1501000727
- Prokof'eva N.G., Chaikina E.L., Kicha A.A., Ivanchina N.V. Biological activities of steroid glycosides from starfish // Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol. 2003. V. 134. P. 695–701.
https://doi.org/10.1016/S1096-4959(03)00029-0
- Silchenko A.S., Imbs T.I., Zvyagintseva T.N. et al. Brown alga metabolites – inhibitors of marine organism fucoidan hydrolases // Chem. Nat. Compd. 2017. V. 53. № 2. P. 345–350.
https://doi.org/10.1007/s10600-017-1985-4

Effect of Phlorethol from the Brown Alga *Costaria costata* (Turn.) Saund. (Order Laminariales) on Gametes and Embryogenesis of the Sea Urchin *Strongylocentrotus intermedius* (A. Agassiz, 1864)

M. I. Kiseleva^a, T. I. Imbs^a, I. Yu. Bakunina^a

^aElyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

The effect of a fraction of phlorethol (CcPh), one of the polyphenolic compounds isolated from the brown alga *Costaria costata* (Turn.) Saund (Laminariales), on gametes and embryogenesis of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* (A. Agassiz, 1864) was studied. Using a model of developing sea urchin embryos, it was shown that phlorethol at concentrations ≤ 700 $\mu\text{g/mL}$ did not exert cytotoxic effect on early developmental stages (from zygote to 16-celled stage blastomere). The embryotoxic effect of phlorethol, causing death of 50% of embryos, was expressed in a concentration (I) range of $50 < I \leq 100$ $\mu\text{g/mL}$ only after 24 h of incubation, in the blastula stage. When exposed to concentrations of ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$, embryos that survived to the blastula stage did not develop further and died after 36 h of incubation. Under the effect of phlorethol, the fertilizing capacity of sea urchin spermatozoa and oocytes reduced. The concentration of phlorethol inhibiting fertilization by 50% (IC_{50}) when acting on sperm was 1.28 ± 0.38 $\mu\text{g/mL}$ and when acting on oocytes was 3.83 ± 0.82 $\mu\text{g/mL}$. Thus, phlorethol reduces the fertilizing capacity of sea urchin gametes at concentrations much lower than embryotoxic concentrations and can potentially find practical application as part of new contraceptive drugs for mammals and humans.

Keywords: brown algae, *Costaria costata*, embryos, sperm, oocytes, sea urchin, *Strongylocentrotus intermedius*, phlorethol, polyphenols