

УДК 615.37:[615.324:596.2]

Е.С. Моторя¹, Т.Н. Пивненко¹, А.К. Гажжа², Л.А. Иванушко², В.Н. Воронцов³, Н.М. Санина³

¹ТИНРО-центр (690091 г. Владивосток, пер. Шевченко, 4), ²НИИ эпидемиологии и микробиологии Сибирского отделения РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1), ³Дальневосточный государственный университет (690950 г. Владивосток, ул. Октябрьская, 25)

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ И МЕМБРАНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ КАРОТИНОИДОВ ИЗ ТУНИКИ АСЦИДИИ *HALOCYNTHIA AURANTIUM*

Ключевые слова: асцидия, каротиноиды, функциональная активность нейтрофилов, мембранотропное действие.

Исследована иммуномодулирующая и мембранотропная активность каротиноидов из туники асцидии *Halocynthia aurantium*. Показано наличие 12 компонентов, среди которых преобладают ксантофиллы: астаксантин, аллоксантин, диатоксантин, галоцинтиаксантин, фукоксантинол, митилоксантинон. Галоцинтиаксантин присущ только этому объекту и используется для идентификации препаратов на его основе. По оригинальному запатентованному методу выделен масляный экстракт из туники асцидии, зарегистрированный в качестве биологически активной добавки к пище. Показано, что препарат стимулирует бактерицидную и фагоцитарную активность нейтрофилов, антиокислительные свойства сыворотки крови, замедляет интенсивность перекисных процессов, оказывает противовоспалительный и гемостимулирующий эффекты. Каротиноиды из туники асцидии обладают мембранотропной активностью, способны связываться с фосфолипидами и стабилизировать структуру мембран. Полученные результаты позволяют рекомендовать биологически активную добавку «Масляный экстракт асцидии» для расширенных клинических испытаний.

Гидробионты морских и пресноводных акваторий отличаются от наземных организмов значительным разнообразием вторичных метаболитов, существенная часть которых представлена функциональными соединениями. К веществам такого типа относятся каротиноиды, к настоящему времени из природных источников выделено более 650 представителей этого класса веществ. Наблюдая широкое распространение и разнообразие каротиноидов в растительном и животном мире, необходимо отметить важную роль этих соединений для протекания нормальных физиологических процессов.

В настоящее время установлено, что каротиноиды проявляют антиоксидантную, иммуномодулирующую, противоопухолевую активности, а также способны модулировать экспрессию генов, обеспечивая защиту от экспериментальных воспалительных повреждений и неопластических трансформаций [9, 13, 14]. На примере астаксантина, типичного для многих морских животных, показано, что его антиоксидантная активность в десять раз превышает аналогичные свойства β-каротина [13]. Галоцинтиаксантин проявляет ингибиторное действие к РНК-зависимой ДНК-полимеразе вируса иммунодефицита человека 1-го и 2-го типов [12]. Также установлено, что неоксантин и фукоксантин индуцируют апоптоз опухолевых клеток простаты человека [11].

Пивненко Татьяна Николаевна — д-р биол. наук, завсектором биохимии лаборатории биохимии гидробионтов ТИНРО-центра; тел.: 8 (4232) 40-08-05; e-mail: pivnenko@tinro.ru.

В дальневосточных и арктических морях широко распространена асцидия *Halocynthia aurantium*, в тунике которой обнаружены уникальные по составу и свойствам каротиноиды, среди которых преобладают окисленные формы — аллоксантин, диатоксантин, митилоксантинон, галоцинтиаксантин, астаксантин и другие.

Присутствие в каротиноидах большого количества (11 и более) двойных связей придает им высокую биологическую активность, которая проявляется в торможении процессов перекисного окисления липидов и определяет такие их биологические функции, как предотвращение предраковых и возрастных повреждений, радиационных поражений, сердечно-сосудистых заболеваний. Молекулярные механизмы, ответственные за указанные эффекты, еще не ясны, но велика вероятность вовлечения в эти процессы антиоксидантных свойств каротиноидов, а также их воздействия на физические свойства клеточных мембран. Регуляторные эффекты каротиноидов, вероятно, обусловлены их способностью встраиваться в мембранные фосфолипидно-белковые структуры, и, тем самым, изменять текучесть мембран. Это может сопровождаться как модификацией взаимодействий между липидами и белками, так и существенно влиять на антиоксидантную активность каротиноидов. По мере увеличения длины полиеновой цепочки возрастает степень ее стабилизации и увеличивается антиоксидантная активность [4]. Животные, а также человек, не могут синтезировать каротиноиды *de novo*, их поступление зависит только от источников питания. Таким образом, широкий спектр биологических активностей каротиноидов, содержащихся в морских организмах, свидетельствует о целесообразности их выделения и использования в лечебных и профилактических целях. Поэтому целью настоящей работы был анализ иммуномодулирующей и мембранотропной активностей каротиноидов из туники асцидии *H. aurantium*.

Материалы и методы. Асцидия пурпурная *H. aurantium* была выловлена в заливах Петра Великого и Посыет (Японское море). Свежевыловленную асцидию разделяли, заготавливали тунику, мантию, гонады и пищеварительную железу и хранили до анализа при температуре –25°C (не более трех недель).

Выделение и определение количественного содержания каротиноидов в органах и тканях гидробионта проводили спектрофотометрическим методом [1]. Экстракт каротиноидов получали по методу,

описанному в патенте РФ № 2339387 «Способ получения биологически активной добавки из асцидии».

Для исследования иммуномодулирующей активности использовали неинbredных мышей массой 14–16 г, находившихся на стандартной диете в боксированных помещениях с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах.

Мышам (8 особей в группе) в течение 21 дня вводили перорально экстракт каротиноидов в дозах 50 и 0,5 мкл на мышь. Контрольной группе животных вводили физиологический раствор. Через 21 день мышам вводили внутривентриально 1 мл стерильного 1% раствора пептона, через 4 часа (для получения популяции нейтрофилов) под эфирным наркозом в брюшную полость вводили по 4 мл раствора Хэнкса без фенолового красного с гепарином (5 ЕД/мл), в течение 2 мин массировали брюшко, затем отсасывали содержимое брюшной полости, центрифугировали однократно при 1000 об./мин. Надосадочную жидкость сливали, клетки ресуспензировали в растворе Хэнкса, довели до концентрации 2×10^6 /мл, исследовали фагоцитарную [3] и бактерицидную [6] активности нейтрофилов перитонеальной полости мышей (по отношению к *Staphylococcus aureus*, штамм 209), а также антиоксидантную активность крови мышей [2, 7].

Общую антиоксидантную активность (АОА) плазмы крови выражали в процентах. Первоначально определяли разницу (ΔE) между показателями до и после инкубации в присутствии окислителей:

$$\Delta E_{on} = E_{on_t} - E_{on_o} \text{ и } \Delta E_k = E_{k_t} - E_{k_o},$$

где E_{on_o} , E_{k_o} – экстинкции проб до инкубации, E_{on_t} , E_{k_t} – экстинкции проб после инкубации. Конечная формула расчета:

$$АОА = (\Delta E_k - \Delta E_{on} / \Delta E_k) \times 100\%.$$

Для изучения мембранотропной активности каротиноидов из туники асцидии исследовали их влияние на термотропный фазовый переход дипальмитоилфосфотидилхолина (ДПФХ) методом дифференциальной сканирующей калориметрии. ДПФХ 99% чистоты был приобретен у Sigma Chemical Co. (США).

Для дифференциальной сканирующей калориметрии ДПФХ (2 мг) или смесь ДПФХ с каротиноидами (в молярном соотношении 1,7 и 5) вносили в стандартные микроконтейнеры, смешивали с 10 мкл бидистиллированной воды, герметично запаковывали и помещали в дифференциальный сканирующий калориметр ДСМ-2М (НПО «Биоприбор», Россия). В качестве образца сравнения использовали контейнер, содержащий такое же количество воды. Образцы нагревали/охлаждали со скоростью сканирования $16^\circ\text{C}/\text{мин}$ в интервале от 10 до 60°C при чувствительности 40 мВт. Положение максимума теплопоглощения на температурной шкале определяли как температуру фазового перехода. Энтальпию перехода опре-

деляли по площади эндотермического пика перехода и по известной энтальпии стандартного образца индия. Температурную шкалу калибровали по стандартным образцам нафталина, ртути и индия.

Статистический анализ проводили с использованием прикладного пакета Biostat. Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Первоначально было определено содержание каротиноидов в различных органах и тканях асцидии. Для этого использовали общепринятый метод исчерпывающей экстракции этих компонентов с помощью ацетона. В дальнейшем была изучена экстрактивная способность других растворителей, в том числе тех, которые могут быть использованы для получения биологически активных добавок (БАД) к пище. Предлагаемый нами метод получения БАД включает реэкстракцию каротиноидов из этанолового экстракта в растительное масло. При этом наблюдается практически полный переход искомых компонентов в жировую фазу, чего не удается достичь прямой масляной экстракцией. Способ и получаемый продукт защищены патентом РФ № 2339387.

Наибольшее количество каротиноидов содержится в тунике, которая и была выбрана в качестве сырья для изготовления экстракта. В мантии, пищеварительной железе и гонадах концентрация каротиноидов значительно ниже, чем в тунике (табл. 1).

Японскими учеными был проведен сравнительный анализ состава каротиноидов асцидий: *Styela clava*, *Botryllus schlosseri*, *Didemnum moseleyi*, *Amaroucium pliciferum*, *Styela plicata*, *Halocynthia roretzi*, *Ascidia zara*, *Ciona intestinalis*, *Botrylloides violaceus* и *Polycitor proliferus* [15]. Показано, что фукоксантинол, галоцинтиаксантин, метилоксантин и метилоксантинон присутствуют в большинстве видов этих гидробионтов. Все соединения являются метаболитами фукоксантина, источником которого является фитопланктон. В целом содержание каротиноидов в семействе асцидий схоже (табл. 2).

Исследования масляного экстракта асцидии пурпурной показали, что содержание тяжелых металлов, радионуклидов и его микробиологическая контаминация не превышают норм, указанных в СанПин 2.3.2.1078, регламентирующих показатели безопасности БАД к пище. Препарат прошел экспертизу в Роспотребнадзоре РФ и зарегистрирован в Реестре БАД. Получено СЭЗ № 77.99.13.003.Т.002367.10.07.

Таблица 1

Содержание каротиноидов в тканях и органах асцидии пурпурной

Органы и ткани	Каротиноиды, мг/100 г ткани
Мантия	16,68
Туника	36,76
Пищеварительная железа	10,80
Гонады	3,17

Таблица 2
Наиболее распространенные каротиноиды семейства асцидий

Наименование	% от общего кол-ва каротиноидов	
Каротины: β -каротин	0,3–5,3	
Ксантофиллы	лютеин	0,1–2,0
	зеаксантин	0,9–10,2
	диатоксантин	0,7–12,0
	аллоксантин	10,0–43,0
	астаксантин	0,6–5,3
	фукоксантин	0,2–15,6
	фукоксантинол	1,5–12,4
	галоцинтиаксантин	1,0–15,7
	метилоксантин	1,9–14,0
	метилоксантинон	11,0–36,6

Таблица 3
Действие экстракта каротиноидов на бактерицидную активность нейтрофилов перитонеальной полости мышей

Образец	Доза, мкл на мышь	НСТ-тест ¹ , OD $\times 10^3$
Контроль	0,0	93,4 \pm 1,5
Экстракт каротиноидов	50,0	107,8 \pm 5,9 ²
Экстракт каротиноидов	0,5	104,1 \pm 3,3 ²

¹ Тест восстановления нитросинего тетразолия.

² Разница с контролем статистически значима.

Результаты токсикологической экспертизы показали, что экстракт из туники асцидии не вызывал гибели мышей в течение 2 недель и не вызывал побочных реакций. Образцы вводили внутриастрально в дозах, превышающих рекомендуемые активные в 100 раз.

При исследовании бактерицидной и фагоцитарной активности нейтрофилов перитонеальной полости мышей были использованы дозировки, соответствующие рекомендуемым, и в 100 раз меньшие (табл. 3, 4). При этом различие в бактерицидной активности при столь значительном различии в дозировках оказалось невелико.

При введении мышам экстракта каротиноидов в дозе 0,5 мкл на особь количество клеток, участвующих в фагоцитозе, увеличивалось на 20%, однако среднее число микроорганизмов, поглощенных одним фагоцитом, практически не изменялось по сравнению с контролем (табл. 4). При введении экстракта в дозе 50 мкл на особь фагоцитарный показатель не менялся, хотя фагоцитарное число увеличилось в 2 раза. Антиокислительные свойства крови значительно повышались под действием экстракта каротиноидов. В дозе 50 мкл на мышь АОА увеличивалась почти в 2 раза. Накопление малонового диальдегида в модельной системе при дозе экстракта 0,5 мкл было существенно ниже, чем в контроле (табл. 5).

Температура фазового перехода чистого ДПФХ (без каротиноидов, выделенных из туники *H. auranti*

Таблица 4
Действие экстракта каротиноидов на фагоцитарную активность нейтрофилов перитонеальной полости мышей

Образец	Доза, мкл на мышь	ФП ¹ , %	ФЧ ²
Контроль	0,0	64 \pm 4,2	1,98 \pm 0,3
Экстракт каротиноидов	50,0	68 \pm 5,2	4,80 \pm 0,8 ³
Экстракт каротиноидов	0,5	83 \pm 6,6	2,60 \pm 0,3

¹ Фагоцитарный показатель.

² Фагоцитарное число.

³ Разница с контролем статистически значима.

Таблица 5
Действие экстракта каротиноидов на антиокислительную активность крови мышей.

Образец	Доза, мкл на мышь	АОА, %	МДА ¹ , нмоль/г
Контроль	0,0	15,2 \pm 3,5	9,4 \pm 0,4
Экстракт каротиноидов	50,0	32,2 \pm 3,8 ²	8,4 \pm 0,3
Экстракт каротиноидов	0,5	25,5 \pm 3,6 ²	7,2 \pm 0,5 ²

¹ Малоновый диальдегид.

² Разница с контролем статистически значима.

tium) составляла 42°C, что соответствует литературным данным [10]. Добавление 1,7 мольного % каротиноидов мало отражалось на этом показателе, который снижался всего на 2°C, но резко влияло на энтальпию фазового перехода, которая снижалась с 7,0 до 3,4 Дж/г. Одновременно с этим исчезал предпереход при 37°C, который характерен для водной дисперсии ДПФХ. Добавление 5 мольных % каротиноидов приводило к полному исчезновению калориметрического фазового перехода ДПФХ (рис.).

Обсуждение полученных данных. Таким образом, проведенные исследования показывают, что пурпурная асцидия может служить источником биологически активных соединений, а именно каротиноидов, отличающихся уникальным составом и свойствами. При этом разработанный способ получения в составе масляного экстракта позволяет использовать их в качестве БАД к пище. Для асцидии, как и для большинства морских организмов, характерно наличие окисленных форм каротиноидов – ксантофиллов (для данного объекта более 12 соединений), обладающих более мощным антиоксидантным потенциалом, предполагающим высокую биологическую активность. В данном исследовании установлена способность масляного экстракта асцидии стимулировать бактерицидную и фагоцитарную активность нейтрофилов перитонеальной полости. При этом одновременно усиливаются антиоксидантные свойства сыворотки крови, что соответствует замедлению интенсивности перекисных процессов.

Другим важным следствием уникальных физико-химических свойств молекул каротиноидов асцидии является их способность встраиваться в мембраны. Эффект каротиноидов из туники асцидии на фазовый переход ДПФХ (уменьшение энтальпии при

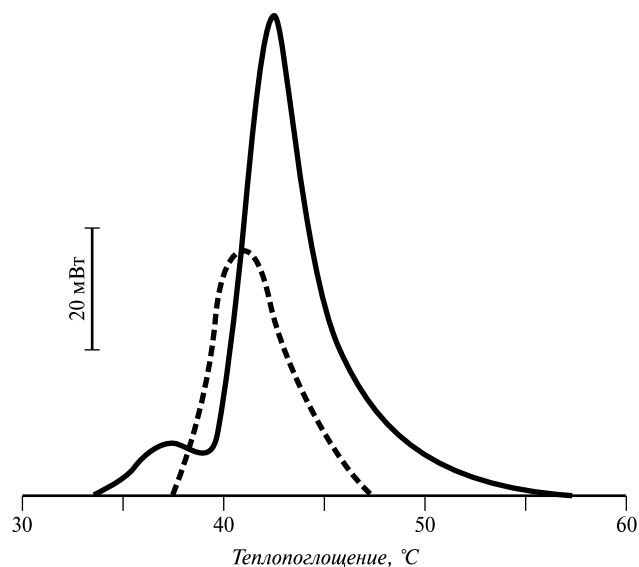


Рис. Термограммы фазовых переходов гидратированного ДПФХ (сплошная линия) и его смеси с 1,7 мольного % каротиноидов из туники *H. aurantium* (пунктирная линия).

малоизменяющейся температуре перехода) подобен действию холестерина, который является одним из мембранообразующих компонентов плазматических мембран животных и обладает «пластифицирующим» действием на жидкость фосфолипидов [5]. Молекулы каротиноидов, благодаря полиизопреноидным цепям с конъюгированными двойными связями, обладают жесткой гидрофобной структурой, что также характерно для молекул холестерина. Поэтому такие соединения, встраиваясь в гидрофобный кор мембран, оказывают двойное действие на их физическое состояние: разжижают в гелевом состоянии и, наоборот, действуют как затвердитель в жидкокристаллическом состоянии. В результате биомембраны с высоким содержанием холестерина не проявляют калориметрических переходов [8]. Этот «ликвидирующий» эффект холестерина связан с тем, что фосфолипидные молекулы, окруженные холестерином, вероятно, не способны к участию в кооперативном процессе, поскольку холестерин иммобилизует фосфолипидные молекулы и исключает их из фазового перехода.

Полученные данные позволяют предполагать, что каротиноиды из туники асцидии связываются с фосфолипидами, то есть обладают мембранотропной активностью и так же, как холестерин, стабилизируют структуру мембран.

Интересно отметить, что калориметрический переход ДПФХ исчезал при добавлении 5 мольных % каротиноидов из туники асцидии, тогда как растительные каротиноиды с различной структурой оказывали подобный эффект при заметно больших концентрациях [10]. Так, в присутствии 5 мольных % виолаксантина, зеаксантина, бета-каротина или лютеина еще регистрировался отчетливый калориметрический переход ДПФХ, тогда как каротин и ликопен мало снижали энтальпию перехода даже при концентрации 10 мольных %. Следовательно, каротиноиды из туники асци-

дии обладают значительно большей фосфолипидсвязывающей, а значит, и мембранотропной активностью по сравнению с растительными каротиноидами. Физическое состояние мембранных липидов имеет большое значение для регуляции активности мембранных рецепторов, сенсорных белков и ионных каналов, что, в свою очередь, может быть использовано для создания кардио- и гепатопротекторов.

Полученные результаты позволяют рекомендовать БАД «Масляный экстракт асцидии» для расширенных клинических испытаний.

Литература

1. Белорукова А.А., Задорожный П.А., Пивненко Т.Н. и др. Оценка содержания каротиноидов у асцидий *Halocynthia aurantium* и *Styella clava* // Известия ТИНРО. 2006. Т. 147. С. 347–353.
2. Бородин Е.А., Арчаков А.И. Стабилизация и реактивация цитохрома P-450 фосфатидилхолином при перекисном окислении липидов // Биологические мембраны. 1987. № 7. С. 719–728.
3. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунология в клинической практике. М.: Наука, 1990. 224 с.
4. Лебская Т.К., Толкачева В.Ф., Варсанович Е.А., и др. Применение БАД «Рыбий жир с каротиноидами из морского огурца» в терапии больных гипертонической болезнью и ИБС с ожирением // Биологически активные добавки к пище: XXI век: тез. докл. междунар. симп. СПб., 2000. С. 89.
5. Санина Н.М., Костецкий Э.Я. Влияние холестерина на фазовые переходы фосфатидилхолина, полученного из асцидии *Halocynthia aurantium* // Журн. эвол. биохим. физиол. 1995. Т. 31, № 1. С. 366–369.
6. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО, 1995. 220 с.
7. Чумак А.Д., Миленина Н.И., Слуцкая Т.Н. и др. Влияние различных добавок на окисление липидов и качество соленых лососевых // Известия ТИНРО. 1992. Т. 114. С. 167–174.
8. Huang T.H., Lee C.W., Das Gupta S.K. et al. A ¹³C and ²H nuclear magnetic resonance study of phosphatidylcholine/cholesterol interactions: characterization of liquid-gel phases // Biochemistry. 1993b. Vol. 32. P. 13277–13287.
9. Konishi I., Hosokawa M., Sashima T. et al. Halocynthiaxanthin and fucoxanthinol isolated from *Halocynthia roretzi* induce apoptosis in human leukemia, breast and colon cancer cells // Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2006/ Vol. 142, Is. 1–2. P. 53–59.
10. KostECKA-GUGALA A., LATOWSKI D., STRZALKA K. Thermotropic phase behaviour of α -dipalmitoylphosphatidylcholine multilayers is influenced to various extents by carotenoids containing different structural features – evidence from differential scanning calorimetry. Biochim. Biophys. Acta. 2003. Vol. 1609. P. 193–202.
11. Kotake-Nara E., Asai A., Nagao A. Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells // Cancer Lett. 2005. Vol. 220, No. 1. P. 75–84.
12. Loya S., Kashman Y., Hizi A. The carotenoid halocynthiaxanthin: a novel inhibitor of the reverse transcriptases of human immunodeficiency viruses type 1 and type 2 // Arch. Biochem. Biophys. 1992. Vol. 293, No. 2. P. 208–212.
13. Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids // Pure & Appl. Chem. 1991. Vol. 63, No. 1. P. 141–146.
14. Nishino H., Tsushima M., Matsuno T., et al. Anti-neoplastic effect of halocynthiaxanthin, a metabolite of fucoxanthin // Anticancer Drugs. 1992. Vol. 3, No. 5. P. 493–497.
15. Ookubo M., Matsuno T. Carotenoids of Sea Squirts – II. Comparative Biochemical studies of carotenoids in Sea Squirts // Comp. Biochem. Physiol. 1985. Vol. 81B, No. 1. P. 137–141.

Поступила в редакцию 06.04.2009.