

УДК 577.115+593.96:687.5(265.3)

## ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИО- И ФУНГИСТАТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛИПИДНОЙ ФРАКЦИИ И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ИЗ ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫХ ВИДОВ ГОЛОТУРИЙ

Л.С. Долматова<sup>1</sup>, Н.Ф. Тимченко<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Тихоокеанский океанологический институт им. В.И. Ильичева ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Балтийская, 43),

<sup>2</sup> Институт эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690027 г. Владивосток, ул. Сельская, 1)

**Ключевые слова:** экстракт из голотурий, липиды, бактериостатическое действие, фунгистатическая активность.

В эксперименте на крысах исследован вклад липидной фракции комплекса биологически активных веществ экстракта из дальневосточных голотурий *Eupentacta fraudatrix* и *Cicumaria japonica* в его бактериостатическое и фунгистатическое действие, проведены доклинические испытания сенсibiliзирующих свойств экстракта. Показано, что фракция общих липидов комплекса в концентрации 5–20 мкг/мл полностью тормозила рост *Yersinia pseudotuberculosis* в течение 2 суток инкубации *in vitro*, а полное ингибирование роста *Candida albicans* происходило при концентрации липидов 14–56 мкг/мл уже через сутки. Установлено отсутствие сенсibiliзирующей активности экстракта в дозе 6 мг/кг и незначительная сенсibiliзирующая активность препарата в дозе 60 мг/кг. Не отмечено также кожно-раздражающего действия препарата. В целом проведенные исследования свидетельствуют о важной роли липидной фракции экстракта из голотурий в его дерматологических эффектах, что может иметь значение для дальнейшей разработки препаратов из этих гидробионтов.

Липиды играют большую роль в устойчивости кожи к различным заболеваниям, в том числе акне, аллергической патологии, бактериальным инфекциям [9]. В частности, лечебную эффективность многих косметических средств обеспечивают входящие в их состав холестерин и жирные кислоты. Однако наиболее перспективными здесь являются фосфолипиды. В регенерирующей косметике используются сфинголипиды (сфингофосфолипиды), в основе которых лежит длинноцепочечный аминспирт сфингозин, а также их метаболиты церамиды (жирнокислотные эфиры сфингозина), получаемые преимущественно из растений. Заполняя пространство между ороговевшими клетками, церамиды повышают устойчивость эпидермиса. Они способны накапливать и передавать влагу, предупреждая сухость, шелушение, дряблость кожи [9].

Метаболиты сфинголипидов (церамиды, сфингозин, сфингозин-1-фосфат, сфингозинфосфонат) рассматриваются в настоящее время как новый класс вторичных липидных посредников, способных регулировать пролиферацию и размножение клеток [14]. Перспективным источником сфинголипидов могут быть морские беспозвоночные [13]. Оригинальными методами экстракции из тканей дальневосточных

голотурий *Eupentacta fraudatrix*, *Cicumaria japonica*, *Apostichopus japonicus* получен комплекс биологически активных веществ (БАВ), эффективно ингибирующий рост грибов и бактерий [3]. Экстракт отличается относительно небольшим содержанием липидов (до 8%), при этом доля нейтральных жиров в их общем количестве составляет до 88% [4]. Доля фосфолипидов составляет 12–18% (в зависимости от вида голотурий). На основе экстракта была разработана серия лечебно-профилактических косметических средств «Пентакан».

Представляется вероятным, что экстракт из голотурий может оказывать выраженное защитное действие на кожу за счет присутствия в нем целого ряда веществ липидной природы. Вместе с тем необходимо учитывать, что многие комплексы биологически активных веществ из морских животных обладают значительным сенсibiliзирующим эффектом.

Целью данного исследования явился анализ вклада липидной фракции комплекса БАВ из голотурий в его бактериостатическое и фунгистатическое действие, а также доклинические испытания сенсibiliзирующих свойств экстракта.

**Материал и методы.** Экстракцию БАВ из тканей голотурий *E. fraudatrix* и *C. japonica* проводили по собственной методике [3]. Общие липиды выделяли посредством метаноловодно-хлороформной экстракции [10]. Для испытаний противомикробной активности использовали несущий плазмиду вирулентности штамм бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* 512 pYV+, выделенный от больного человека. Противогрибковую активность испытывали по отношению к *Candida albicans*. Микроорганизмы из исходного разведения, а также через 1, 2 и 3 суток инкубирования с образцами липидов при 37°C высевали на плотную диагностическую среду 67 [7]. Антимикробную активность оценивали по числу колониеобразующих единиц (КОЕ) [8]. Сенсibiliзирующее действие экстракта изучали по ГОСТ Р ИСО 10993.10–99 [2].

При исследовании сенсibiliзирующей активности экстракта использовали крыс-самок линии Вистар массой 230±20 г. Животные были разделены на три группы по 5 особей: 1) контрольная группа,

Долматова Людмила Степановна – канд. биол. наук, вед. н. с. лаборатории биофизики ТОИ ДВО РАН; тел.: 8 (4232) 31-25-80, e-mail: dolmatova@poi.dvo.ru



Таблица 3  
Влияние экстракта из голотурий на массу иммунокомпетентных органов

Орган	Индекс массы, мг/100 г (M±m)		
	контроль	опыт	
		6 мг/кг	60 мг/кг
Тимус	147,0±9,7	146,0±15,3	101,8±3,3*
Селезенка	267,0±41,9	319,0±27,4	348,4±12,9*

\* Разница с контролем статистически значима.

отсутствовали или присутствовали в незначительном количестве (до 4,2±0,11 %), то при дозе экстракта 6 мг/кг 6,3±0,17 % клеток образовывали мелкие агглютинаты. При дозе 60 мг/кг отмечены более крупные агрегаты (до 28,0±0,11 % клеток). Таким образом, некоторый рост концентрации агглютинирующих антител зарегистрирован только в сыворотках животных, получавших экстракт в дозе 60 мг/кг.

При постановке реакции дегрануляции тучных клеток были получены следующие значения показателя дегрануляции: в контроле – 0,074±0,012 %, при дозе экстракта 6 мг/кг – 0,105±0,050 %, при дозе экстракта 60 мг/кг – 0,053±0,008 % (т.е., достоверного роста выраженности дегрануляции по сравнению с контролем не выявлено).

Комплекс БАВ из голотурий в концентрации 6 мг/кг не оказывал влияния на массу тимуса и селезенки (по сравнению с контролем). Однако индекс массы тимуса достоверно снижался при использовании экстракта в дозе 60 мг/кг, а индекс массы селезенки при этом увеличивался (табл. 3). Формирование гуморального иммунного ответа, в частности, продукция специфических иммуноглобулинов связано главным образом с селезенкой [6]. Поэтому такое изменение массы иммунокомпетентных органов может свидетельствовать о некоторой сенсibilизации, вызванной очень высокой дозой препарата.

В целом проведенные исследования свидетельствуют о важной роли липидной фракции комплекса БАВ из голотурий в его дерматологических эффектах, что может иметь значение для дальнейшей разработки лекарственной формы препарата из этих гидробионтов.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 08-04-99141).

#### Литература

1. Алексеева О.Г., Дуева Л.А. Аллергия к промышленным химическим соединениям. М.: Медицина, 1978. 271 с.
2. ГОСТ Р ИСО 10993.10-99: Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10. Исследование раздражающего и сенсibilизирующего действия. М.: Издательство стандартов. 2000. 31 с.
3. Долматова Л. С., Долматов И. Ю. Композиция для лечения и профилактики кожных заболеваний и ран у человека и животных. Патент RU № 2183962.27.06.2002 // Бюл. № 18. 2002.

4. Долматова Л.С., Тимченко Н.Ф., Фоменко С.Е. и др. Исследование состава и бактерицидного действия липидной фракции комплекса биологически активных веществ косметического средства «пентакан» // Фитофарм 2006: материалы X Международного съезда 27–30 июня 2006 г. СПб, 2006. С. 67–71.
5. Иммунологические методы / под ред. Г. Фримеля. М.: Медицина, 1987. 472 с.
6. Петров Р.В. Иммунология. М.: Медицина, 1987. 416 с.
7. Серов Г.Д., Вишняков А.К., Знаменский В.А. Методика выделения псевдотуберкулезного микроба // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1968. № 6. С. 146–149.
8. Фурзикова Т.М., Сергейчук М.Г., Сорокулова И.Б., Смирнов В.В. Влияние условий культивирования на некоторые свойства бацилл, составляющих основу пробиотиков // Микробиологический журнал. 1999. Т. 61, № 5. С. 19–27.
9. Эрнандес Е.И., Марголина А.А., Петрухина А.О. Липидный барьер кожи и косметические средства. М.: Фирма «Клавель», 2003. 340 с.
10. Folch J., Less M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. Vol. 226, No. 1. P. 497–509.
11. Kissmeyer-Nielsen J., van Rood J.J. Micro-agglutination test // Manual of tissue typing techniques. Bethesda: National Institute of Health, 1972. P. 1–2.
12. Kruger P.G. The histamine release process and concomitant structural changes in rat peritoneal mast cells // Int. Archs. Allergy appl. Immunol. 1976. Vol. 51. P. 608–626.
13. Mukhamedova K.S., Glushenkova, A.I. Natural phosphonolipids // Chem. Nat. Compounds. 2000. Vol. 36. P. 329–341.
14. Van Brocklyn J.R., Lee M.-J., Menzelev R. et al. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival // J. Cell. Biol. 1998. Vol. 142, No. 1. P. 229–240.

Поступила в редакцию 04.02.2009.

#### STUDYING BACTERIOSTATIC AND FUNGOSTATIC PROPERTIES OF LIPID FRACTION AND PRE-CLINICAL TRIALS OF SENSITIZING POWER OF THE FAR EASTERN HOLOTHURIAN EXTRACTS

L.S. Dolmatova<sup>1</sup>, N.F. Timchenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> V.I. Il'ichov Pacific Oceanological Institute of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences (43 Baltiyskaya St. Vladivostok 690041 Russia), <sup>2</sup> Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690027 Russia)

**Summary** – The paper discusses experimentally investigated role of lipid fraction of a number of biologically active substances derived from the Far Eastern holothurians Eupentacta fraudatrix and Cucumaria japonica in activating bacteriostatic and fungostatic properties, and provides pre-clinical trials of its sensitizing properties. As indicated, the total lipid fraction with the concentration of 5 to 20 mg/kg is capable of entirely inhibiting the growth of Yersinia pseudotuberculosis during two days of the in vitro incubation. The lipids with the concentration of 14 to 56 mg/kg are capable of completely inhibiting the growth of Candida albicans during one day. The authors point out there is no sensitizing powers of the extract at the dose of 6 mg/kg, minor sensitizing activity at the dose of 60 mg/kg and absent skin irritant effects. As a whole, the studies highlight an important role of the lipid fraction derived from the holothurians in producing dermatological effects that appear to be of significance for further practical investigations of the hydrobiotic-derived substances.

**Key words:** holothurian extracts, lipids, bacteriostatic effects, fungostatic properties.