

9. Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T. et al. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 21770–21776.
10. Ponce N.M.A., Pujol C.A., Damonte E.B. Fucoida from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies // *Carbohydr. Res.* 2003. Vol. 338. P. 153–165.
11. Shibata H., Iimuro M., Uchiya N. et al. Preventive effects of *Cladosiphon fucoidan* against *Helicobacter pylori* in Mongolian gerbils // *Helicobacter*. 2003. Vol. 8. P. 59–65.
12. Silva T.M.A., Alves L.G., Queiroz K.C.S. et al. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora* // *Braz. J. Biol. Res.* 2005. Vol. 38. P. 523–533.
13. Soeda S., Kozako T., Iwata K., Shimeno H. Oversulfated fucoidan inhibits the basic fibroblast growth factor-induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells: Its possible mechanism of action // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. Vol. 1497. P. 127–134.
14. Yamamoto I., Takahashi M., Suzuki T. et al. Antitumor effect of seaweeds. IV. Enhancement of antitumor activity by sulfation of a crude fucoidan fraction from *Sargassum kjellmanianum* // *Jpn. J. Exp. Med.* 1984. Vol. 54, No. 4. P. 143–151.
15. Zhuang C., Itoh H., Mizuno T., Ito H. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, *umitoranoo* (*Sargassum thunbergii*) // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995. Vol. 59, No. 4. P. 563–567.

Поступила в редакцию 12.01.2010.

EFFECT OF LAMINARIA JAPONICA-DERIVED FUCOIDAN ON EHRlich ADENOCARCINOMA AND LEWIS LUNG CARCINOMA, AND EFFICIENCY OF CYCLOPHOSPHANE IN MICE

T.G. Razina¹, E.P. Zueva¹, E.N. Amosova¹, S.G. Krylova¹, M.Yu. Khotimchenko², K.A. Lopatina¹, L.A. Efimova¹, E.A. Safonova¹, O.Yu. Ryibalkina¹

¹ Research Institute of Pharmacology, SB RAMS (3 Lenina Av. Tomsk 634028 Russia), ² Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia)

Summary – The paper presents study into anti-tumor and anti-metastatic effects of sulphated polysaccharide fucoidan derived from sea brown algae *Laminaria japonica* using models of passaged Ehrlich adenocarcinoma and Lewis lung carcinoma in mice. The average molecular mass of the specimen under study was 75 kDa. Fucoidan was introduced orally at a dose of 50 and 100 mg/kg. Fucoidan has had no effect on the growth of Ehrlich adenocarcinoma and cyclophosphane's efficiency. At a dose of 100 mg/kg fucoidan had inconsiderable but reliable decrease in mass of primary tumor of Lewis lung carcinoma, and at both dosages reliably decreased number of metastatic focuses. Given fucoidan, the anti-metastatic effect of cyclophosphane increased 1.7 to 2.5 times.

Key words: fucoidan, brown algae, Ehrlich adenocarcinoma, Lewis lung carcinoma.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 2, p. 36–39.

УДК

С.П. Касьянов¹, Н.А. Латышев¹, В.И. Светашев¹, Т.П. Новгородцева², Ю.К. Караман², Т.И. Виткина²

¹ Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (690041 г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17),

² НИИ медицинской климатологии и восстановительного лечения Владивостокского филиала Дальневосточного научного центра физиологии и патологии дыхания СО РАМН (690105 г. Владивосток, ул. Русская, 73г)

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ К ПИЩЕ НА ОСНОВЕ МОНОАЛКИЛГЛИЦЕРИНОВ

Ключевые слова: алкилглицерины, метаболизм липидов, экспериментальная дислипидемия.

Исследованы состав 1-О-алкилглицериновых эфиров (АГЭ), полученных из липидов печени командорского кальмара *Berryteuthis magister* и их влияние на метаболизм липидов, состояние гепатобилиарной, антиоксидантной систем и гематологические параметры крыс в условиях экспериментальной алиментарной дислипидемии. Выявлены антиоксидантные, противоанемические и иммуностимулирующие свойства АГЭ, разработана технологическая схема их получения, стандартизирован состав биологически активной добавки к пище. Предлагается широкое использование АГЭ из липидов печени командорского кальмара в реабилитации пациентов при различных патологических состояниях.

Морские гидробионты являются источником $\omega 3$ полиненасыщенных жирных кислот ($\omega 3$ ПНЖК). Известные фармакологические свойства этих соединений позволяют использовать их источники для профилактики и лечения целого ряда заболеваний [15]. Однако наличие в сложных липидных смесях из морских гидробионтов других активных компонентов является причиной детального изучения биологических свойств этих препаратов. К числу липидов, представляющих интерес для медицины, относятся

1-О-алкил-глицериновые эфиры (АГЭ), входящие в состав коммерческих препаратов жира из печени полярной акулы. Значительные количества АГЭ обнаружены в тканях ряда морских гидробионтов – командорского кальмара *Berryteuthis magister* (до 20 % в липидах печени), камчатского краба (около 4 % в липидах гепатопанкреаса) [4, 5, 6].

В предварительных исследованиях биологического действия липидов печени командорского кальмара в условиях экспериментальной кардиовасопатии помимо позитивного влияния на метаболические процессы отмечались и негативные эффекты: гипертриглицерин- и гиперлипопероксидемия, ожирение печени, деструкция гепатоцитов, эритро- и лимфоцитоз, снижение времени свертываемости крови [6, 7]. Эти эффекты не характерны для известных свойств $\omega 3$ ПНЖК. Биологически активным началом здесь являются АГЭ, которые образуются в тонком кишечнике из алиментарных алкил-диацилглицеринов под действием липаз. Будучи предшественником фактора активации тромбоцитов, провоспалительного агента, АГЭ способны провоцировать кардиореспираторные нарушения и усиливать тромбоцитарную дегрануляцию [3, 9, 13]. Детальное исследование АГЭ, выделенных из суммарной липидной

фракции гидробионта, позволит выявить особенности биологического действия липидных препаратов и БАД к пище на их основе.

Целью настоящего исследования стали разработка технологического процесса получения АГЭ из липидов печени командорского кальмара и анализ их влияния на метаболизм липидов, состояние гепатобилиарной, антиоксидантной систем и гематологические параметры в условиях экспериментальной алиментарной дислипидемии (ДЛЕ).

Материал и методы. Заготовленная печень командорского кальмара *Berryteuthis magister* поступила из ОАО «Находкинская база активного морского рыболовства». Выделение жира, его рафинацию и сушку проводили стандартными методами [1]. Для получения АГЭ жир подвергали щелочному гидролизу для высвобождения жирных кислот из 2-го и 3-го положений глицерина. Далее смесь липидов растворяли в ацетоне и кристаллизовали при 0°C, после чего осадок отфильтровывали и повторно кристаллизовали из ацетона при той же температуре. Осадок после второй кристаллизации и сушки выглядел как белый рассыпчатый порошок без запаха и привкуса с температурой плавления около 70°C [2]. Препарат был получен на экспериментально-технологическом участке ИБМ ДВО РАН и зарегистрирован в качестве биологически активной добавки к пище под наименованием «Липидомарин».

Липиды фракционировали на колонке с силикагелем, используя последовательно элюирующие системы гексан–этилацетат (1:1) и хлороформ. Состав АГЭ в виде TMS-производных определяли на хромато-масс-спектрометре GC-MS Shimadzu QP 5050A. Пробу TMS-производных готовили, добавляя к 2 мг образца 0,2 мл силилирующего реактива BSTFA, и выдерживали 1 час при температуре 60°C. Условия анализа: колонка MDN-5S, 3 м×0,5 мм, температура инжектора – 250°C, температура детектора – 250°C. Программа: температура колонки – 200°C, 3 мин, затем повышение по 2°C/мин до 260°C, далее – при 260°C – 10 мин; газ-носитель гелий, линейная скорость потока 30 см/мин. Идентификацию пиков проводили, используя стандартные смеси TMS-производных АГЭ.

Фракционированием липидов удалось получить субстанцию АГЭ с чистотой более 98% и со стандартизированным составом вне зависимости от состава липидов исходной печени. АГЭ из печени кальмара включает в себя до 20% ненасыщенных АЭГ, но благодаря разработанной технологии [2] в препарате присутствуют только насыщенные соединения (табл. 1). Это дает следующие преимущества: во-первых, целевой препарат имеет высокую точку плавления, что делает возможным его таблетирование, а во-вторых, отсутствие ненасыщенных радикалов и примесей ненасыщенных жирных кислот позволяет длительное хранение БАД – до 2 лет (по рекомендациям НИИ питания РАМН, Москва).

Таблица 1

Состав АГЭ из печени кальмара (БАД «Липидомарин»), %

Содержание основного вещества		>98
Содержание индивидуальных АГЭ, от общей суммы ¹	14:0	3,5
	15:0	0,2
	16:0	90,5
	17:0	0,8
	18:0	5,0
Примеси нежирового характера		отсутствуют

¹ Радикалы в 1-м положении глицерина, первая цифра – длина углеродной цепочки радикала, вторая – число двойных связей.

Таблица 2

Суточный рацион крыс, г/кг

Ингредиент	Рацион	
	для развития ДЛП	стандартный
Лярд (свиное сало)	42,5	5,0
Холестерин	4,3	0,0
Подсолнечное масло	5,0	5,0
Смесь зерновая	50,0	50,0
Хлеб пшеничный	20,0	20,0
Крупа овсяная	13,0	13,0
Мясо говяжье	20,0	20,0
Творог обезжиренный	8,0	8,0
Морковь	33,0	33,0
Зелень	33,0	33,0
Дрожжи пивные	0,5	0,5
Соль поваренная	0,1	0,1

Биологические испытания выполняли на белых крысах-самцах линии Вистар массой 280±20 г, которых содержали в виварии в соответствии с санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Животных выводили из опыта путем декапитации под эфирным наркозом в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609 ЕЕС [12]. В исследовании использовали 3 группы по 10 крыс: контроль – интактные крысы, 1-я группа – крысы с алиментарной ДЛЕ, 2-я группа – крысы с алиментарной ДЛЕ, получавшие АГЭ (БАД «Липидомарин») 15 мг/кг массы тела (что соответствовало суточным нормам, установленным для человека). Модель алиментарной ДЛЕ вызывали разбалансированным по составу жиров рационом с включением высококалорийных продуктов и холестерина в течение 30 дней (табл. 2). После чего всех животных переводили на стандартную диету. Крысам 2-й группы ежедневно интрагастрально вводились АГЭ в течение 21 дня.

Уровень глюкозы, общего холестерина, триглицеридов, холестерина липопротеидов высокой плотности, активность аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и лактадегидрогеназы (ЛДГ) определяли на анализаторе FP-901 (Labsistems, Финляндия). Антиоксидантную активность и содержание гидроперекисей липидов плазмы крови, а также

Таблица 3

Биохимические и гематологические показатели крови крыс с алиментарной дислипидемией, $M \pm m$

Показатель ¹	Интактная	Дислипидемия	
		1-я группа	2-я группа
Глюкоза, ммоль/л	5,47±0,11	8,78±0,29 ²	10,65±0,29 ^{2,3}
Общий холестерин, ммоль/л	1,57±0,04	3,34±0,04 ²	2,93±0,20 ²
Триглицериды, ммоль/л	1,12±0,04	1,95±0,06 ²	1,48±0,14 ^{2,3}
ХС ЛПВП, ммоль/л	0,67±0,04	0,26±0,02 ²	0,70±0,03 ³
Индекс атерогенности	1,43±0,15	11,87±1,55 ²	3,25±0,18 ^{2,3}
АЛТ, ммоль/л	52,21±3,50	108,90±3,57 ²	144,50±12,22 ^{2,3}
АСТ, ммоль/л	118,61±6,10	243,90±9,10 ²	237,70±16,55 ²
ЛДГ, ммоль/л	936,61±133,08	1799,00±176,86 ²	2599,00±249,75 ^{2,3}
АОА, %	23,91±0,19	41,71±3,09 ²	37,40±2,20 ²
МДА, мкмоль/г Нб	5,12±0,22	9,01±0,20 ²	8,41±0,26 ²
МДА/АОА	0,13±0,006	0,22±0,02 ²	0,23±0,01 ²
ГПЛ, у.е.	0,79±0,03	3,49±0,11 ²	1,21±0,04 ^{2,3}
Каталаза, %	85,35±0,58	73,21±1,02 ²	84,20±1,29 ²
Эритроциты, 10 ¹² /л	22,95±0,91	20,24±0,65 ²	28,86±0,52 ^{2,3}
Гемоглобин, г/л	110±2,74	93,90±4,90 ²	150,70±2,46 ^{2,3}
Нб/эр., пг	4,89±0,28	3,67±0,17 ²	5,23±0,12 ²
Цветной показатель	1,46±0,08	1,09±0,05 ²	1,51±0,03 ²
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	315,00±9,68	349,00±10,27 ²	455,00±19,22 ^{2,3}
Время свертывания крови, с	22,80±0,71	10,60±0,65 ²	24,50±0,58 ^{2,3}
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,16±0,14	8,48±0,12 ²	8,13±0,50 ²
Лимфоциты, %	22,2±0,92	18,00±0,34 ²	31,40±1,64 ^{2,3}

¹ ХС ЛПВП — холестерин липопротеидов высокой плотности, АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспаратаминотрансфераза, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, АОА — антиоксидантная активность, МДА — малоновый диальдегид, ГПЛ — гидроперекиси липидов, Нб/эр. — среднее содержание гемоглобина в эритроците.

² Разница с контролем статистически значима.

³ Разница с 1-й группой статистически значима.

уровень малонового диальдегида и активность каталазы в эритроцитах определяли по Т.П. Новгородцевой и др. [8]. Гематологические параметры исследовали на анализаторе Abacus (США). Статистическую значимость различий вычисляли по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования. Формирование алиментарной ДЛЕ характеризовалось гиперхолестеринемией, гипертриглицеринемией и гипергликемией. Наблюдалось повышение ферментативной активности печени, накопление продуктов липопероксидации, снижение общей антиоксидантной активности крови. Развитие модели сопровождалось уменьшением числа эритроцитов в периферической крови, замедлением времени свертываемости крови и снижением количества иммунокомпетентных клеток.

Введение АГЭ при ДЛЕ вызывало уменьшение уровня триглицеридов в сыворотке крови на 24,2 % и увеличение содержания холестерина липопротеидов высокой плотности на 63 %. Уровень общего холестерина под влиянием АГЭ не изменялся, индекс атерогенности снизился в 3,6 раза, концентрация глюкозы повысилась на 21,3 %. Во 2-й группе также зарегистрировано значимое по сравнению с 1-й группой увеличение активности лактатдегидрогеназы (на 30 %) и аланинаминотрансферазы (на 24 %).

Состояние системы «перекисное окисление липидов — антиоксидантная защита» после использования АГЭ характеризовалось высокой каталазной активнос-

тью, что способствовало выведению гидроперекисей липидов из крови (их уровень снизился в 3 раза), однако общая антиоксидантная активность оставалась на уровне 1-й группы. Наблюдалась слабая тенденция к снижению уровня малонового диальдегида в эритроцитах. После применения АГЭ общее количество эритроцитов в крови увеличилось на 40 %, уровень гемоглобина в крови и содержание гемоглобина в эритроцитах выросли на 38 и 43 % соответственно. Количество тромбоцитов повысилось на 30 %, лимфоцитов — на 43 %, время свертываемости крови увеличилось на 57 %. Количество лейкоцитов не изменилось (табл. 3).

Обсуждение полученных данных. Проведение только одной одной кристаллизации не позволяло получить достаточно чистый продукт: содержание свободных жирных кислот превышало 10 %. Продукт имел темный цвет и сильный запах рыбного жира. Вторая кристаллизация удаляла свободные жирные кислоты практически полностью — их содержание не превышало 2 %. Это насыщенные кислоты, в первую очередь пальмитиновая и миристиновая. В конечном продукте полностью отсутствовали холестерин и его эфиры (табл. 1).

В эксперименте выявлен гипотриглицеринемический эффект АГЭ. При этом уровень общего холестерина в крови оставался повышенным, что объясняется способностью липидов с алкильной группой ингибировать реакции этерификации холестерина

лецитин-холестерин-ацилтрансферазой [3]. Гипергликемия может быть результатом снижения толерантности клеток печени к инсулину в результате их повреждения. Об этом свидетельствует и высокая активность аланинаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы в крови. Повышение активности каталазы после применения АГЭ и снижение концентрации начальных продуктов липопероксидации говорят об антиоксидантных свойствах этих эфиров, что подтверждают литературные данные [10, 11]. Назначение АГЭ приводило к увеличению количества клеток красной и белой крови, усиливало гемоглобинсинтетические способности эритроцитов. Возможно, механизм этого эффекта связан с влиянием алкоксилипидов на гемопоез через повышение концентрации ионов кальция в цитозоле, что является пусковым механизмом формирования вторичных посредников, обеспечивающих пролиферацию гемопоэтических клеток [14].

1-О-алкилглицериновые эфиры продемонстрировали антиоксидантные, противоанемические и иммуностимулирующие влияния, хотя выявленные гипергликемия, гиперферментемия и повышенный уровень холестерина в крови указывали на некоторые их негативные эффекты. В предыдущих работах нами были описаны сложные, но понятные взаимодействия между АГЭ и $\omega 3$ ПНЖК [4]. Было показано, что наибольший положительный биотропный эффект достигался при необходимом участии $\omega 3$ ПНЖК, которые компенсировали негативные эффекты АГЭ. Поскольку в задачи настоящего эксперимента не входило совместное применение АГЭ и $\omega 3$ ПНЖК, мы предполагали, что воздействие АГЭ на сосудистую систему и ткани будет отчасти жестким. Но только таким способом можно было оценить индивидуальный вклад этих соединений в биологическую активность липидных композиций из морских гидробионтов. Обнаруженные при этом гипергликемия, гиперхолестеринемия и другие эффекты не являются критическими и могут быть нивелированы совместным применением АГЭ с препаратами $\omega 3$ ПНЖК [4] или на фоне потребления рыбных продуктов, богатых этими кислотами.

Таким образом, разработанный технологический процесс обеспечивает постоянство состава целевого препарата из печени камчатского кальмара. На животных препарат АГЭ оказывает гемо-, иммуностимулирующий и антиоксидантный эффекты. Полученные данные позволяют рекомендовать БАД из липидов печени камчатского кальмара для курса реабилитации пациентов при различных патологических состояниях.

Литература

1. Касьянов С.П., Бочаров Л.Н., Акулин В.Н., Якуш Е.В. Способ получения жира из печени кальмара / Патент РФ № 2241026 от 27.11.2004 г.
2. Касьянов С.П., Латышев Н.А. Способ получения алкилглицериновых эфиров / Заявка на пат. РФ № 2009134366 от 09.09.2009 г.
3. Куликов В.И., Музя Г.И. Биорегуляторная роль фактора активации тромбоцитов во внутриклеточных процессах и межклеточных взаимодействиях // Биохимия. 1998. Т. 63. № 1. С. 57–66.

4. Новгородцева Т.П., Караман Ю.К., Виткина Т.И., Касьянов С.П. Сравнительная характеристика биологической активности жиров из гепатопанкреаса камчатского краба и печени камчатского кальмара // Вестник ДВО РАН. 2007. № 6. С. 105–110.
5. Новгородцева Т.П., Касьянов С.П., Виткина Т.И. и др. Разработка липидных препаратов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты, из печени камчатского краба // Вопр. биол. мед и фарм. химии. 2006. № 1. С. 47–52.
6. Новгородцева Т.П., Касьянов С.П., Виткина Т.И. Биологические эффекты препарата природных алкил-диацилглицеринов при экспериментальной кардиовасопатии у крыс // Эксперим. и клин. фармакология. 2005. Т. 68, № 2. С. 55–58.
7. Новгородцева Т.П., Караман Ю.К., Гвозденко Т.А. и др. Дозозависимый эффект биологически активной добавки к пище «Магистр-ойл» при экспериментальной сердечно-сосудистой патологии // Бюл. физиологии и патологии дыхания. 2007. Вып. 25. С. 63–67.
8. Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А., Янькова В.И. Руководство по методам исследования параметров системы «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» в биологических жидкостях. Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2003, 80 с.
9. Acevedo R., Gil D., del Campo J. et al. The adjuvant potential of synthetic alkylglycerols // Vaccine. 2006. Vol. 12, No. 24. P. 32–36.
10. Brohult A., Brohult J., Brohult S., Joelsson I. Effect of alkylglycerol on the frequency of injuries following radiation therapy for carcinoma of the uterin cervix // Acta Obstetrica and Gynecologica Scandinavica. 1977. Vol. 56. P. 441–448.
11. Brohult A., Brohult J., Brohult S., Joelsson I. Effect of alkylglycerol on the frequency of fistulas following radiation therapy for carcinoma of the uterin cervix // Acta Obstetrica and Gynecologica Scandinavica. 1979. Vol. 58. P. 203–207.
12. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes / Strasbourg: Council of Europe, 1986, 51 p.
13. Farooqui A.A., Horrocks L.A. Plasmalogens, platelet-activating factor, and other ether glycerolipids // Bioactive Lipids / ed. by A. Nicolaou, G. Kokotos. Bridgewater: The Oily Press, 2004. P. 107–134.
14. Frishein R., Brohult J., Rohstein-Rubin R. The effects of alkylglycerols on cellular growth and sensitivity to chemotherapeutic agents in tumor cultures // Tumor biology and human genetics. 1999. Vol. 9. P. 134–138.
15. Simopoulos A.P. Essential fatty acids in health and chronic diseases / Forum Nutr, 2003. Vol. 56. P. 67–70.

Поступила в редакцию 22.01.2010.

PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF MONOALKYLGLYCEROL-BASED DIETARY SUPPLEMENT

S.P. Kasianov¹, N.A. Lатышев¹, V.I. Svetashev¹, T.P. Novgorodtseva², Yu.K. Karaman², T.I. Vitkina²

¹ Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmundsky, FEB RAS (17 Palchevskogo St. Vladivostok 690041 Russia),

² Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation of Vladivostok branch of Far Eastern Research Centre of Physiology and Respiration Pathology, SB RAMS (73g Russkaya St. Vladivostok 690105 Russia)

Summary – The authors have studied composition of 1-O-alkylglycerol ethers (AGE) derived from liver lipids of *Berryteuthis magister* squid and their effect on lipid metabolism, state of hepatobiliary, anti-oxidative systems and hematological parameters of rats in case of experimental alimentary dislipidemy. Antioxidative, antianemic and immune-modulating effects of AGE allowed developing a derivation method and standardizing composition of dietary supplement. The authors recommend wide application of AGE derived from *Berryteuthis magister* squid liver lipids to rehabilitate patients in case of various pathological conditions.

Key words: alkylglycerols, lipid metabolism, experimental dislipidemy.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 2, p. 39–42.