

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 ресуспендировали 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 дипальмитойлфосфотидилхолина (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 разных 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×10 ³
Контроль	0,0	93,4±1,5
Экстракт каротиноидов	50,0	107,8±5,9 ²
Экстракт каротиноидов	0,5	104,1±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 внутригастрально 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±4,2	1,98±0,3
Экстракт каротиноидов	50,0	68±5,2	4,80±0,8 ³
Экстракт каротиноидов	0,5	83±6,6	2,60±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±3,5	9,4±0,4
Экстракт каротиноидов	50,0	32,2±3,8 ²	8,4±0,3
Экстракт каротиноидов	0,5	25,5±3,6 ²	7,2±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

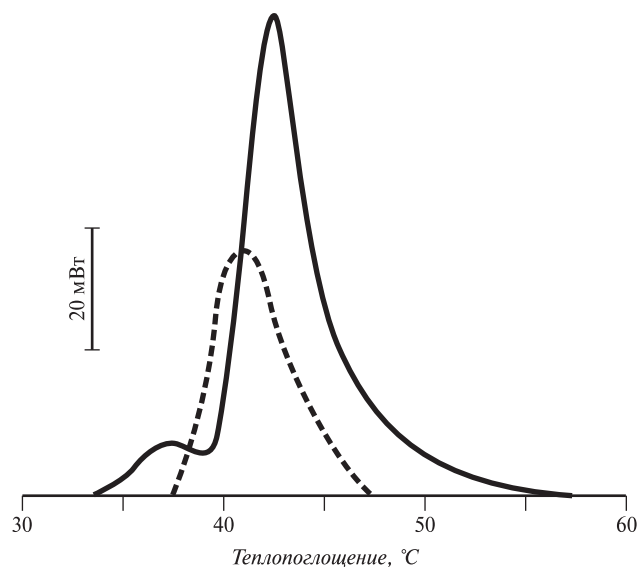


Рис. Термограммы фазовых переходов гидратированного ДПФХ (сплошная линия) и его смеси с 1,7 мольного % каротиноидов из туники *H. aurantium* (пунктирная линия).

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 ^{13}C 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.

STUDY ON IMMUNE-RESPONSE MODULATING AND MEMBRANE-ACTING EFFECTS OF CAROTENOIDS DERIVED FROM THE TUNIC OF ASCIDIA

HALOCYNTHIA AURANTIUM

E.S. Motorya¹, T.N. Pivnenko¹, A.K. Gazha², L.A. Ivanushko², V.N. Vorontsov³, N.M. Sanina³

¹ TINRO-Centre (4 Shevchenko Lane Vladivostok 690091 Russia), ² Research Centre of Epidemiology and Microbiology of the RAMS, Siberian Branch (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia), ³ Far Eastern National University (25 Oktyabrskaya St. Vladivostok 690950 Russia)

Summary — The paper discusses immune-response modulating and membrane-acting effects of carotenoids derived from the *Halocynthia aurantium* ascidia tunic and gives consideration to 12 components, among which xanthophylls are dominant. These are: astaxanthin, alloxantin, diatoxanthine, halocynthi-

axanthine, fucoxanthinol, and methylxanthine. Halocynthi-axanthine is peculiar to this form and used to identify halocynthi-axanthine-based drugs. Original patented method has allowed to derive oily extract from the ascidian tunic registered as dietary supplement. As shown, this medication induces bactericidal and phagocytic activities of neutrophils, antioxidative properties of blood serum, inhibits peroxidation, and produces anti-inflammatory and hemostimulating effects. The ascidian tunic carotenoids have membrane-acting properties and capability to be bound together with phospholipids and stabilize membrane structure. The findings allow recommending the dietary supplement "Ascidian-Derived Oily Extract" for advanced clinical testing.

Key words: *ascidia, carotenoids, functional activity of neutrophils, membrane-acting effects.*

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 28–32.

УДК 615.37:577.114:[615.324:594.124]

И.В. Чикаловец¹, В.И. Молчанова¹, Д.Л. Аминин¹, О.В. Черников¹, Е.А. Пислягин², П.А. Лукьянов¹

¹ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН (690022, г. Владивосток, пр-т 100 лет Владивостоку, 159),

² Дальневосточный государственный университет (690950, Владивосток, ул. Суханова, 8)

НЕОМИТИЛАН – НОВЫЙ ИММУНОМОДУЛЯТОР ИЗ МИДИИ *CRENOMYTILUS GRAYANUS*

Ключевые слова: полисахариды, беспозвоночные, иммуномодулирующая активность.

Исследована иммуномодулирующая и противовоспалительная активность неомитилана – полисахарида из мидии *Crenomytilus grayanus*. В отличие от ранее выделенного из этой же мидии полисахарида – митилана, неомитилан не проявляет алергизирующих свойств, т.к. содержит не более 1,5% белка. В эксперименте показано, что неомитилан на 25–30% усиливает фагоцитарную активность макрофагов *in vitro* и более чем в 2 раза по сравнению с митиланом повышает активность лизосомальных ферментов макрофагов и стимулирует формирование активных форм кислорода. При этом, так же как и митилан, неомитилан не обладает токсическими свойствами *in vivo* и не проявляет цитотоксической активности *in vitro*. Установлено, что неомитилан способен снижать уровень перекисного окисления липидов и активность нитроксидсинтазы. Сделан вывод, что митилан вследствие описанных свойств может служить основой для получения лекарственных препаратов.

Поиск регуляторов иммунных процессов привлекает в последние десятилетия пристальное внимание большого числа исследователей. Вещества, оказывающие регулирующее влияние на иммунную систему, получили общее название иммуномодуляторов. К ним относятся различные химические соединения, важное место среди них принадлежит биогликанам – полисахаридам и гликоконъюгатам природного происхождения. В качестве иммуномодулятора из различных видов мидий, обитающих в Японском и Черном морях, ранее нами был выделен биогликан – митилан, исследованы его физико-химические и биологические свойства [2]. Однако присутствие потенциально алергогенной белковой компоненты (3–8%) ограничивает использование этого биогликана в качестве медицинского препарата.

Чикаловец Ирина Владимировна – канд. хим. наук, старший научный сотрудник ТИБОХ ДВО РАН; тел.: 8 (4232) 31-07-19; e-mail: ivchik6@mail.ru.

Целью настоящей работы явился сравнительный анализ биологической активности неомитилана (белковая компонента не более 1,5%) и митилана, выделенных из мидии *Crenomytilus grayanus*.

Материал и методы. Использовались первичные культуры клеток млекопитающих и техники молекулярных флуоресцентных зондов. Эксперименты выполнены на мышах линий CD-1 (весом 19–21 г), СВА (самки весом 19–21 г) и Balb/C (весом 18–20 г). Мыши содержались в стандартных условиях вивария ТИБОХ ДВО РАН с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей.

Для определения острой токсичности раствор неомитилана в дистиллированной воде в различных концентрациях вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл на животное (по 5 мышей в каждой группе). Наблюдение и оценка токсического эффекта проводились в течение 12 дней.

Для определения цитотоксической активности *in vitro* получали лимфоциты из селезенки мышей линии CD-1 [9]. В лунки 96-луночного планшета вносили по 20 мкл неомитилана в разных концентрациях и по 200 мкл суспензии спленоцитов (2–5×10⁶ клеток/мл) и инкубировали 1 час при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора флуоресцеиндиацетата (50 мкг/мл) в диметилсульфоксиде и снова инкубировали 15 мин при 37°C. Клетки облучали светом с длиной волны λ_{ex} = 485 нм, флуоресценцию регистрировали при λ_{em} = 518 нм. Измерение проводили с помощью флуоресцентного планшетного фотометра Fluoroskan Ascent (Thermo LabSystems, Финляндия). Все эксперименты повторяли дважды.