

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, antioxygenic 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 алергеной белковой компоненты (3–8%) ограничивает использование этого биогликана в качестве медицинского препарата.

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 внутривенно 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 ($2\text{--}5 \times 10^6$ 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 $\lambda_{\text{ex}} = 485$ нм, флуоресценцию регистрировали при $\lambda_{\text{em}} = 518$ нм. Измерение проводили с помощью флуоресцентного планшетного фотометра Fluoroskan Ascent (Thermo LabSystems, Финляндия). Все эксперименты повторяли дважды.

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

За 100% принимали флуоресценцию лунок, в которые вместо исследуемого вещества добавляли по 20 мкл физраствора.

Для определения лизосомальной активности в брюшинную полость мышей линии СВА вводили тестируемые препараты в концентрации 300 мкг на особь: 3 мыши — митилан, 3 мыши — неомитилан и 3 мыши — физраствор (контроль). Через 4 дня по методу Р. Адамса [1] получали макрофаги из перитонеальной жидкости и помещали их в специальные камеры для анализа изображений. На клеточный монослой наносили 200 мкл раствора флуоресцентного зонда (акридиновый оранжевый, 10 мкМ конечная концентрация) в физиологическом растворе и оставляли камеры в термостате при 37°C на 30 мин, после чего клетки трижды отмывали физраствором. Затем камеры монтировали на предметном столе флуоресцентного микроцитометра Axiovert 200 (Zeiss, Германия) и проводили измерение интенсивности флуоресценции клеток с использованием системы регистрации флуоресцентного изображения (Cairn Research Ltd., Англия). Клетки облучали светом длиной волны $\lambda_{ex}=488$ нм, флуоресценцию регистрировали при $\lambda_{em}=520$ нм.

Интенсивность флуоресценции 300 случайно выбранных изображений и оценку лизосомальной активности в клетках осуществляли инструментальными средствами программы AQM Advance 6 (Kinetic Imaging Ltd., Англия). Все эксперименты выполняли трижды. Лизосомальную активность рассчитывали, принимая за 100% активность макрофагов контрольной группы.

Для определения активных форм кислорода (АФК) иммунизацию мышей тест-препаратами и получение макрофагов проводили как в предыдущем эксперименте. На клеточный монослой наносили 200 мкл раствора флуоресцентного зонда (дихлорофлуоресцеин-диацетат, 10 мкМ конечная концентрация) в физрастворе и оставляли в термостате при 37°C на 10 мин. Затем монослой трижды отмывали физраствором, после чего камеры монтировали на предметном столе флуоресцентного микроцитометра и проводили измерение интенсивности флуоресценции клеток. За 100% принимали количество АФК, продуцируемое макрофагами контрольной группы.

Определение фагоцитарной активности клеток, обработанных тестируемыми веществами, проводили в соответствии с общепринятой методикой [6]. Для оценки интенсивности фагоцитоза и реакции внутриклеточного киллинга использовали бактерии *Staphylococcus aureus*, меченные флуоресцеин-изотиоцианатом. Анализ фагоцитарной активности перитонеальных мышинных макрофагов проводили согласно протоколу компании «Молекуляр Пробс» [12]. Макрофаги получали из перитонеальной жидкости мышей линий Balb/C [1]. Клеточный монослой снимали с поверхности чашек с помощью

скрепера. Рабочая концентрация составляла $2-5 \times 10^6$ кл./мл. Тестируемые вещества анализировались в различных концентрациях: 1 мг/мл, 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,1 мкг/мл в 4 повторах для каждой концентрации.

Влияние неомитилана на активность нитроксидсинтазы и процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в легких изучали на трех курящих добровольцах после ингаляции 3 и 10 мг неомитилана на человека однократно. После ингаляции 5 мл соответствующего раствора с помощью ультразвукового ингалятора «Ротор» (Ротор, Барнаул) определяли уровень нитрит-иона и малонового диальдегида (МДА) в конденсате выдыхаемого воздуха (КВВ) в течение первых суток [4].

Изучение алергизирующих свойств неомитилана и митилана проводили в соответствии с общепринятой методикой [5]. Для оценки реакции гиперчувствительности замедленного типа 30 мышей линии СВА (по 10 животных в группе) сенсibilizировали однократно подкожно (в основание хвоста) эмульсией тест-препаратов в полном адьюванте Фрейнда (1:1) в объеме 60 мкл (300 мкг на мышь). Для приготовления эмульсии использовали физраствор. Животным контрольной группы вводили вместо препарата 60 мкл адьюванта с физраствором. На 5-е сутки в подушечку правой лапки мышей вводили 50 мкл раствора тестируемых веществ на физрастворе в дозе 300 мкг на особь. Контрольным животным вводили физиологический раствор в аналогичном объеме. Через 24 часа регистрировали ответ путем определения диаметра правой («опытной») и левой («контрольной») лап. Индекс реакции выражали в процентах прироста диаметра.

Для оценки аллергических реакций немедленного типа выполняли конъюнктивальную пробу. Мышей линии СВА однократно сенсibilizировали путем внутрибрюшинного введения тест-препаратов в дозе 300 мкг на особь. В каждой группе было по 6 животных. Для постановки пробы 1 каплю водного раствора исследуемых веществ (300 мкг) вводили глазной пипеткой под верхнее веко мыши. Через 15 мин учитывали реакцию и оценивали ее визуально по четырехбалльной шкале.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы SigmaPlot 3.02 (Jandel Corporation, США).

Результаты исследования. Наблюдение в течение 12 дней позволило установить, что неомитилан нетоксичен для мышей при внутрибрюшинном введении в дозах от 78,1 до 2500 мг/кг. При действии неомитилана на спленоциты жизнеспособность клеток изменялась в зависимости от концентрации препарата в пределах 75,4–100%, что является допустимым в экспериментах *in vitro*. Следовательно, неомитилан не демонстрировал цитотоксической активности в широком диапазоне доз — от 0,97 до 1000 мкг/мл.

Таблица 1

Влияние неомитилана и митилана на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов

Группа	Кол-во животных	Активность ¹ , %
Контроль	3	100,00
Митилан	3	142,16±3,67
Неомитилан	3	304,26±3,91

¹ m±SE — средняя и стандартная ошибка средней.

Таблица 2

Определение влияния неомитилана и митилана на формирование АФК

Группа	Кол-во животных	АФК ¹ , %
Контроль	3	100,00
Митилан	3	200,11±4,95
Неомитилан	3	148,15±5,86

¹ m±SE — средняя и стандартная ошибка.

Установлено статистически достоверное увеличение лизосомальной активности перитонеальных макрофагов мышей на 4-й день после инъекции тест-препаратов в дозе 300 мкг на особь. Под действием митилана лизосомальная активность увеличивалась примерно на 40% по сравнению с контролем. В случае использования неомитилана в той же дозе лизосомальная активность макрофагов увеличивалась примерно в 3 раза по сравнению с активностью макрофагов контрольных мышей и более чем в 2 раза по сравнению с активностью под действием митилана (табл. 1).

При внутрибрюшинной инъекции митилана и неомитилана в дозе 300 мкг на особь наблюдалось статистически достоверное увеличение АФК по сравнению с контролем в 2 и в 1,5 раза соответственно (табл. 2).

Показано, что тестируемые соединения способны стимулировать фагоцитоз перитонеальных мышинных макрофагов *in vitro*. Максимальная стимулирующая концентрация была 10 мкг/мл, при которой за 2 часа инкубации происходила стимуляция фагоцитоза на 25–30%. При исследовании противовоспалительных свойств неомитилана у всех курящих добровольцев, у которых вследствие патогенного воздействия табачного дыма повышен уровень ПОЛ и активности нитроксидсинтазы в среднем в 2–2,5 раза по сравнению с некурящими, в течение первых 3–5 часов после ингаляции неомитилана наблюдалось достоверное снижение уровня этих показателей в КВВ. Так, концентрация нитрит-иона уменьшалась на 35 и 75% и уровень МДА снижался на 40 и 70% соответственно. Эффект регистрировался и к концу первых суток после ингаляции неомитилана. Следует отметить, что неомитилан при ингаляционном введении не обладает пирогенным эффектом, колебания температуры тела добровольцев не превышали физиологических значений.

Результаты определения аллергических свойств свидетельствуют о том, что неомитилан в исследуе-

Таблица 3

Влияние неомитилана и митилана на гиперергическую реакцию замедленного типа

Группа	Кол-во животных	Диаметр лапы, мм		Индекс, %
		контрольной	опытной	
Контроль	10	1,9500±0,0522	2,1200±0,0998	8,7
Митилан	10	2,1700±0,0955	3,1900±0,1386 ¹	47,1
Неомитилан	10	2,1800±0,1052	2,2700±0,1309	4,12

¹ Разница с контролем статистически значима.

мой дозе практически не влиял на выраженность гиперергии замедленного типа у мышей, в то время как митилан достоверно увеличивал ее индекс на 47,1% (табл. 3). При конъюнктивной пробе исследуемые биогликианы практически не оказывали никакого влияния на аллергическую реакцию немедленного типа.

Обсуждение полученных данных. Одним из проявлений иммуномодулирующей активности биологически активных веществ является их влияние на функции фагоцитирующих клеток и, в частности, на лизосомальную активность макрофагов [8]. Изучение иммуномодулирующих свойств неомитилана показало, что он индуцирует более высокую лизосомальную активность, чем другие полисахариды. Растительные биогликианы из *Acanthopanax sessiliflorus* и *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels увеличивают активность лизосомальных ферментов не более чем на 230% [11, 14], в то время как неомитилан — на 304%. Эти полисахариды не являются гомогликанами и имеют β-гликозидную связь. В литературе имеются противоречивые данные относительно того, какие структурные компоненты (полисахарид или белок) ответственны за проявление активности. Так, японскими авторами при исследовании гликогенов (1,4; 1,6-α-D-глюканов), выделенных различными способами из морского гребешка, сделано заключение о том, что тонкая структура углеводной составляющей имеет определяющее значение в стимуляции иммунной системы [13]. В противоположность этим данным показано, что наличие белковой компоненты в 1,4; 1,6-α-D-глюканах, выделенных из морского моллюска *Ruditapes philippinarum*, усиливает их антиопухолевое и иммуномодулирующее действие [15]. В экспериментах по изучению влияния неомитилана и митилана, являющихся гликогенподобными 1,4; 1,6-α-D-глюканами, на лизосомальную активность перитонеальных макрофагов показано, что неомитилан, содержащий не более 1,5% белка, проявляет более высокую активность по сравнению с митиланом, содержание белка в котором может колебаться от 3 до 8%. Однако способность неомитилана к генерации АФК перитонеальными мышинными макрофагами несколько ниже.

В последнее время большое внимание уделяется исследованию КВВ. На сегодняшний день становится

очевидным, что состав конденсата отражает биохимические и воспалительные процессы в дыхательной системе. Известно, что показателями воспалительных процессов в организме являются повышенные уровни пероксида водорода, монооксида углерода и усиление интенсивности свободнорадикальных реакций ПОЛ. Конечные продукты окисления приводят к образованию биологически активных альдегидов, в частности, МДА, которые участвуют в дальнейших процессах воспаления. Последний является прогностически значимой величиной при изучении ПОЛ [3]. Кроме того, проявления воспалительных процессов в организме связаны с уровнем метаболитов оксида азота. Оксид азота продуцируется при участии конституционной нитроксидсинтазы эндотелия сосудов, нейронов, эпителиальных клеток, а также индуцибельной нитроксидсинтазой [7]. Нами показано, что уровни метаболитов оксида азота и МДА в КВВ у курящих людей значительно понижались в зависимости от концентрации ингалируемого неомитилана. По данным литературы, полисахарид, выделенный из *Tinospora cordifolia*, также снижает уровень ПОЛ, повышенный под действием фотозавозбуждения [10].

При оценке аллергизирующих свойств биогликанов показано, что неомитилан не обладает провоспалительным действием, так как не влияет на выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа и аллергическую реакцию немедленного типа у мышей, в то время как митилан, не оказывая никакого влияния на аллергическую реакцию немедленного типа, существенно увеличивает выраженность гиперергии замедленного типа.

Таким образом, неомитилан, обладая иммуномодулирующими и противовоспалительными свойствами, может служить основой для получения лекарственных препаратов, так как в отличие от митилана, благодаря низкому содержанию белковой составляющей, не вызывает аллергических реакций.

Работа выполнена по теме «Разработка способа включения биологически активных субстанций и биологически активных добавок к пище в молекулярно-капсулированные формы, обеспечивающие повышение их биодоступности и биоэффективности» в рамках государственного контракта № 02.522.11.2013.

Литература

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М.: Мир, 1983. 264 с.
2. Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Молчанова В.И. и др. Сравнительная характеристика иммуномодулирующей активности биогликанов морского происхождения // Антибиотики и химиотерапия. 2001. Т. 46, № 7. С. 6–10.
3. Кокосов А.Н., Гольденберг Ю.М., Мищенко В.П. Перекисное окисление липидов и гемостаз на этапах формирования хронического бронхита и бронхиальной астмы // Пульмонология. 1995. № 1. С. 38–40.
4. Корякова А.Г., Кулакова Н.В., Кобелев С.С. и др. Биохимическая оценка эффективности липосомных форм фенолола // Хим. фарм. журн. 2000. № 6. С. 3–5.
5. Методические указания по оценке аллергизирующих свойств фармакологических веществ: руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Любимов Б.И., Коваленко Л.П., Федосеева В.Н. и др. М., 2000. С. 25–32.
6. Методические указания по изучению иммуотропной активности фармакологических веществ: руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Хаитов Р.М., Гуцин И.С., Пинегин Б.В. и др. М., 2000. С. 257–263.
7. Смирнов А.С., Таганович А.Д. Определение уровня $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ в концентрате выдыхаемого воздуха. Восстановление нитратов цинком // Биомед. химия. 2006. Т. 52, № 1. С. 101–107.
8. Фрейдлин И.С., Тоголян А.А. Клетки иммунной системы. СПб.: Наука, 2001. 390 с.
9. Фрешни Р. Культура животных клеток. Методы. М.: Мир, 1989. 320 с.
10. Desai V.R., Kamat J.P., Sainis K.B. An immunomodulator from *Tinospora cordifolia* with antioxidant activity in cell-free systems // Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.). 2002. Vol. 114, No. 6. P. 713–719.
11. Jeong S.C., Jeong Y.T., Yang B.K. et al. Chemical characteristics and immuno-stimulating properties of biopolymers extracted from *Acanthopanax sessiliflorus* // J. Biochem. Mol. Biol. 2006. Vol. 39. P. 84–90.
12. Molecular Probes protocol for the Vybrant Phagocytosis Assay Kit // Haugland R.P. Handbook of fluorescent probes and research products. 9th Edition, J. Gregory ed., Molecular Probes Inc., 2002.
13. Takaya Y., Uchisawa H., Ichinohe H. et al. Antitumor glycogen from scallops and the interrelationship of structure and antitumor activity // J. Mar. Biotechnol. 1998. Vol. 6. P. 208–213.
14. Yang X., Zhao Y., Wang H. et al. Macrophage Activation by an Acidic Polysaccharide Isolated from *Angelica Sinensis* (Oliv.) Diels // J. Biochem. Mol. Biol. 2007. Vol. 40, No. 5. P. 636–643.
15. Zhang L., Liu W., Han B. et al. Isolation and characterization of antitumor polysaccharides from the marine mollusk *Ruditapes philippinarum* // Eur. Food Res. Technol. 2008. Vol. 227. P. 103–110.

Поступила в редакцию 08.04.2009.

NEOMYTHILANE AS NEW CRENOMYTHILUS GRAYANUS MUSSEL-DERIVED IMMUNE-RESPONSE MODULATING AGENT

I.V. Chikalovets¹, V.I. Molchanova¹, D.L. Aminin¹, O.V. Chernikov¹, E.A. Pislyagin², P.A. Lukianov¹

¹ Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159, 100-Anniversary Av. Vladivostok 690022 Russia), ² Far Eastern National University (8, Sukhanov St. Vladivostok 690950 Russia) Summary — The authors present their study into immune-response modulating and anti-inflammatory activities of neomythilane that is a derivative from the mussels *Crenomytilus grayanus*. Unlike the early mussel-derived polysaccharide mythilane, this product appears not to exhibit allergenic properties because it contains 1.5% of protein, at the most. The in vitro experiments show neomythilane potentiating the macrophage phagocytic activity by 25–30% and increasing activity of macrophage lysosomal enzymes more than two times, and inducing generation of active oxygen forms, as compared to mythilane. In this regard, both mythilane and neomythilane have no toxic properties in vivo, without exhibiting cytotoxic activity in vitro. As determined, neomythilane is capable of reducing lipid peroxidation and nitroxide synthase activities. This allows to consider mythilane as a basis for producing medicines.

Key words: polysaccharides, invertebrates, immune-response modulating activities.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 32–35.