

УДК 664.959

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГИДРОБИОНТОВ НЕПИЩЕВОГО ЗНАЧЕНИЯ В НАРОДНОМ ХОЗЯЙСТВЕ

И. С. Ажгихин, В. Г. Гандель, В. М. Печенников, Н. В. Серебрянников,
В. В. Финкель, В. А. Замуренко

Из огромного количества видов морских организмов лишь незначительная часть в настоящее время используется в пищевых целях и в некоторых отраслях народного хозяйства. Подавляющая часть морских организмов используется в пищу, причем ассортимент пищевых гидробионтов в глобальных масштабах за последние десятилетия расширился незначительно. А между тем резкое возрастание спроса на пищевые продукты, включая высококонцентрированные корма для промышленного животноводства, требует поисков новых пищевых источников. В связи с этим при решении вопроса комплексного использования биологических ресурсов Мирового океана необходимы широкие исследования химии, токсикологии и фармакологии гидробионтов непищевого значения с целью выяснения возможностей их применения в различных отраслях народного хозяйства в качестве концентрированных кормов и источников биологически активных веществ — возможных лечебных препаратов.

Все непищевые гидробионты можно разделить на две основные группы: традиционно не используемые в пищевых целях и ядовитые. Поиск возможностей их эксплуатации должен включать в себя тщательное токсикологическое изучение объектов, выяснение локализации ядов и различных биологически активных веществ, способов утилизации ядов и детоксикации тканей при дифференцированной оценке их значимости, контроль безопасности детоксицированного материала, технологическую схему их переработки и рекомендации для применения в той или иной отрасли народного хозяйства, в частности в животноводстве, химико-фармацевтической, текстильной промышленности, земледелии и др.

Особенно важны исследования по утилизации ядовитых гидробионтов (Humm, Lane, 1974; Ruggieri, 1975), а также по токсикологии гидробионтов неизвестного вида. В настоящее время из непищевых гидробионтов свыше 2,5 тыс. видов считаются ядовитыми, из них свыше 700 составляют рыбы, что значительно превосходит число рыб, добываемых в нашей стране в пищевых целях. Ядовитые гидробионты, на запасы которых практически не влияет деятельность человека, заселяют все новые районы Мирового океана. Многие из них — хищники. Среди ядовитых рыб встречаются очень крупные (до 1 т). Наиболее распространены в морских организмах яды — сакситоксин, сурагатоксин, цигуатоксин, тетродотоксин, макулотоксин, голотурин. Сильнейший яд тетродотоксин образуется в рыбах почти 40 различных видов, голотурин — более чем в 30 видах морских огурцов, а цигуатоксин — в рыбах почти 300 видов.

Как правило, токсические вещества концентрируются в отдельных органах или тканях, и лишь в исключительных случаях равномерно

импрегнируют весь организм гидробионта. Все указанные яды морских организмов очень токсичны. Смертельная доза сакситоксина для взрослого человека составляет 1 мг, а тетродотоксина — еще меньше. В то же время содержание сакситоксина в некоторых морских организмах может быть высоким. В динофлагеллятах некоторых видов сакситоксин составляет до 6% их массы, а моллюски, их поедающие, за сутки накапливают в своих тканях до 180 мг этого яда.

В наше время найдены способы тотального извлечения сакситоксина, тетродотоксина и других ядов и пути их применения. Обычным способом экстракции ядовитых гидробионтов является тщательная сепарация органов и тканей, содержащих ядовитые вещества (печень, молоки, икра, внутренности, кровь, ядовитые железы и т. д.) с последующей гомогенизацией их и экстрагированием токсинов соответствующими растворителями с дальнейшей очисткой.

Если же ядовитыми веществами пропитано большинство тканей гидробионтов, измельчают весь организм, а затем извлекают токсины в батарее экстракторов методом противотока или с применением вихревой экстракции. Полнота извлечения контролируется физико-химическими методами.

Ядовитые вещества — тетродотоксин, сакситоксин, голотурин, используют в зависимости от их фармакологических и токсических свойств.

В 60-е годы нашего столетия была принципиально доказана возможность применения многих биологически активных веществ гидробионтов, включая яды, в лечебных целях. Тогда же было выяснено, что тетродотоксин обладает удивительной способностью уже в ничтожных дозах блокировать нервно-мышечное проведение, вызывать расслабление гладкой мускулатуры, снижать системное кровяное давление, влиять на функцию центральной и периферической нервной системы.

В последующие годы он нашел применение как мощное обезболивающее средство при проказе и злокачественных новообразованиях. Тетродотоксин вместе с сакситоксином и макулотоксином (ядом из небольшого осьминога *Naraloclaena maculosa*) в настоящее время незаменим при изучении фундаментальных свойств клеточной мембраны и функции нервной системы.

Не менее перспективны в фармакологическом плане и другие токсины ядовитых гидробионтов: кукумариозид, голотурин, мурексин, дигидромурексин, сурагатоксин, гониодомин, гимнодин, примнезин, гомарин, таластин, аллизин, пахутоксин, нереизтоксин, крассин, астерубин, и многие другие.

Гидробионты непищевого значения, включая ядовитые, содержат особую группу биологически активных веществ, относящихся к классу полиеновых кислот, наибольшую ценность из которых представляют высшие жирные кислоты, содержащие 4, 5 и 6 двойных связей в изолированном положении с числом углеродных атомов не менее 20 (тетра-цис-тетраеновая, пента-цис-пентаеновая, докозагексаеновая кислоты).

Экспериментально доказано стимулирующее влияние препаратов указанных кислот на рост молодых животных, в том числе и сельскохозяйственных, нагул, спермато- и оогенез, густоту волосяного покрова, а также их мощный гипохолестеринемический эффект.

Известно и их положительное влияние на фибринолитическую активность крови, содержание триглицеридов в плазме крови, функцию печени, поджелудочной железы и эпителия желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей.

Липиды морских организмов непищевого значения очень богаты полиненасыщенными жирными кислотами (как правило, в виде

глицеридов) (Ржавская, 1976). Обычно содержание тетраеновой кислоты достигает нескольких процентов, а эйкозапентаеновой и докозагексаеновой — нескольких десятков процентов при общем содержании липидов от 2 до 40%.

Полиненасыщенные жирные кислоты получают обычно из гидробионтов непищевого значения переэтерификацией или гидролизом с последующей этерификацией жирных кислот липидов, извлеченных из целых организмов или жиросодержащих органов физическими или химическими методами. Такой способ позволяет одновременно освободиться от липидорастворимого цигуатоксина — яда, самого распространенного среди ядовитых рыб.

Целесообразно использовать липиды неядовитых гидробионтов непищевого значения в качестве возможного заменителя рыбьего жира, получаемого из пищевых сортов рыб, в частности, из жира печени трески. Изучение липидов различных морских организмов в различных странах показывает близость их жирнокислотного состава, особенно по содержанию наиболее ценных компонентов — эфиров полиненасыщенных высших жирных кислот с четырьмя, пятью и шестью двойными связями в изолированном положении с C₂₀₋₂₂.

Это подтверждено нашими исследованиями липидов следующих гидробионтов: антарктического криля (*Euphasia superba*), сайки (*Boreogadus saida*), путассу (*Micromesistius poutassou*), беломорской сельди (*Clupea harengus marisalbi*), голомянки большой (*Сompherogus baicalensis*), печени трески (*Gadus morhua*) и зубатки полосатой (*Anarhichas lupus*).

Крыль был заготовлен в марте 1976 г., путассу — в феврале 1977 г., остальные объекты в ноябре — декабре 1976 г. и сохранялись при температуре минус 30°.

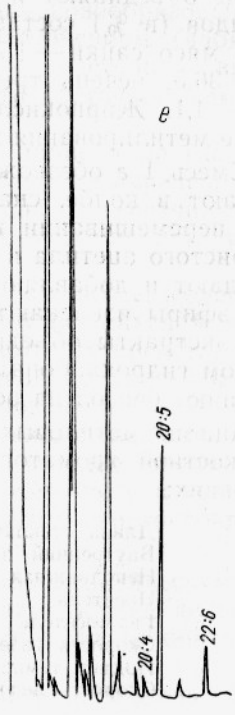
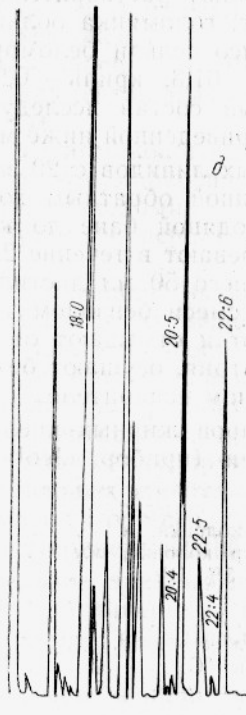
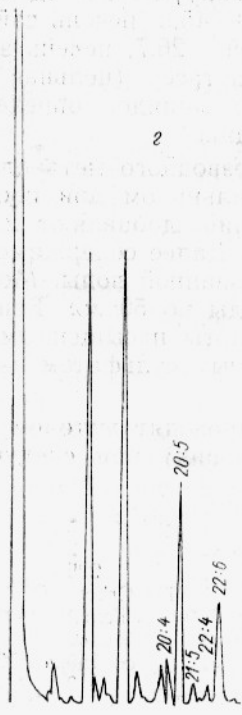
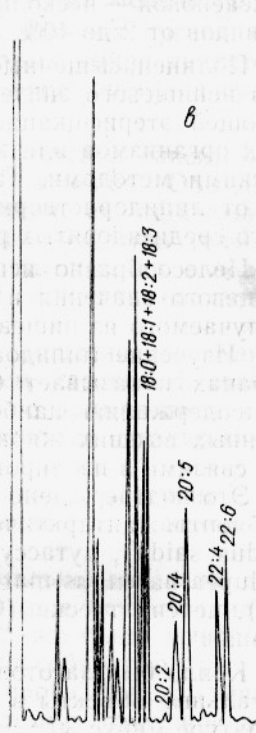
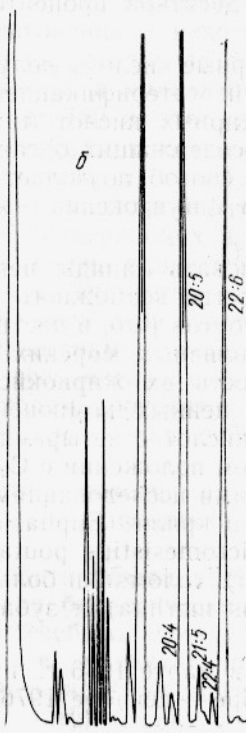
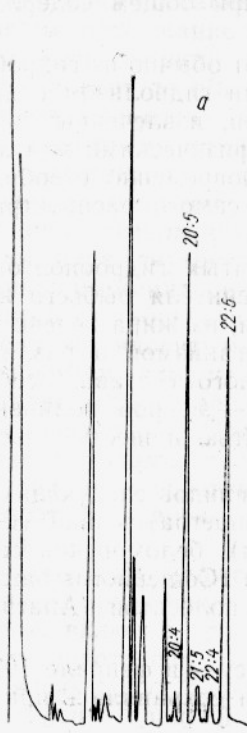
Гомогенизированный в замороженном состоянии объект экстрагируют трижды диэтиловым эфиром при температуре 0 — плюс 4°. Экстракты объединяют и удаляют растворитель в вакууме. Выход общих липидов (в %) составляет: голомянка большая — 45,6, печень сайки — 48,1, мясо сайки — 1,7, мясо сельди беломорской — 26,7, печень зубатки — 36,5, печень трески — 61,3, крыль — 0,91, путассу (цельная рыба) — 4,1. Жирнокислотный состав исследуемых липидов определяют после метилирования по приведенной ниже методике.

Смесь 1 г обезвоженных липидов с 20 мл безводного метанола нагревают в колбе, снабженной обратным холодильником при постоянном перемешивании на водяной бане до кипения, добавляют 2,5 мл хлористого ацетила и нагревают в течение 2,5 ч. Далее содержимое охлаждают и добавляют в него 50 мл дистиллированной воды. Метилловые эфиры извлекают из смеси бензолом трижды по 50 мл. Бензольные экстракты объединяют и отмывают от кислоты насыщенным раствором гидрокарбоната натрия, осушают безводным сульфатом натрия, отгоняют бензол на роторном испарителе.

Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводят методом газожидкостной хроматографии (прибор «Jeol», Япония) при следующих условиях:

Длина стеклянной колонки, м	2
Внутренний диаметр колонки, мм	2
Неподвижная фаза 5% OV	225
Носитель	Gas Chrom Q
Газ-носитель	Гелий
Скорость газа, мл/мин	60
Подъем температуры, °С	со 150 до 220
Скорость подъема, рад/мин	3

Полученные хроматограммы представлены на рис. 1



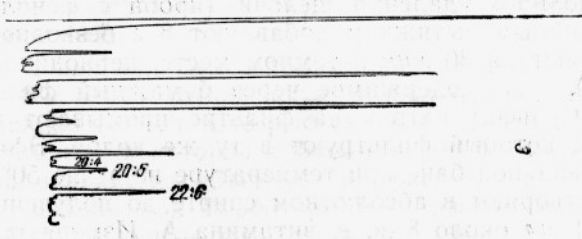


Рис. 1. Газожидкостная хроматограмма метиловых эфиров жирных кислот липидов: а и б — печени трески и сайки; в — голомянки; г — печени зубатки; д — беломорской сельди; е — крыля; ж — сайки; з — путассу (3% OV-17).

Анализ полученных хроматограмм показывает близость жирнокислотного состава липидов исследуемых объектов, особенно по содержанию полиненасыщенных жирных кислот — наиболее активной в биологическом отношении фракции липидов. Так, содержание $C_{20:4}$, $C_{20:5}$, $C_{22:6}$ составляет соответственно в липидах печени трески — 1,5, 15, 10%; печени сайки — 1,1, 26, 18%; голомянки — 2,5, 5,6, 5,2%; печени зубатки — 2,8, 15, 11%; беломорской сельди (мясо) — 1,5, 25, 33%; сайки (мясо) — 0,5, 22, 31,5%; крыля — 1, 7,5, 4%.

С учетом данных о выраженной гипохолестеринемической, липотропной и фибринолитической активности полиеновых кислот была получена высокоочищенная гомологичная по составу фракция этиловых эфиров полиеновых кислот на основе липидов непещевых гидробиионтов. Эта фракция содержала в основном этиловые эфиры эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот и была получена из липидов гидробиионтов (крыля, голомянки большой, сайки и др.) омылением и этерификацией или перэтерификацией, очисткой этиловых эфиров образованием аддуктов с мочевиной, низкотемпературной кристаллизацией и вакуумной разгонкой. Препарат, содержащий 90—94% ные смеси эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот, при проверке его эффективности на модели гиперхолестеринемии кроликов по методу Н. Н. Аничкова и С. С. Халатова наиболее эффективно снижает уровень холестерина, общих триглицеридов и повышает фибринолитическую активность плазмы крови. Арахиден в дозах 50 мг/кг, взятый для сравнения, незначительно уменьшал содержание холестерина и общих триглицеридов, а смесь эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот оказалась почти вдвое активнее.

Витамина А больше всего содержалось в жире голомянки большой — (1180 м. е.), затем — в жире печени трески (700 м. е.), меньше всего — в жирах крыля и путассу. Содержание витамина А определяли по следующей методике. Около 1 г жира (точная навеска) помещают в колбу емкостью 100 мл, прибавляют 30 мл этилового спирта, не содержащего альдегидов, 3 мл 50%-ного раствора едкого кали и

омыляют в течение 30 мин на водяной бане с обратным холодильником при температуре 90°. Содержимое колбы охлаждают, добавляют 50 мл воды и переносят в делительную воронку. Неомыляемую фракцию экстрагируют 50 мл диэтилового эфира, а затем еще 2 раза, 30 мл эфира каждый раз. Объединенные эфирные вытяжки промывают водой по 30—40 мл до полного удаления щелочи (проба с фенолфталеином). К промытым эфирным вытяжкам добавляют 8 г безводного сульфата натрия и оставляют на 30 мин в темном месте, периодически встряхивая. Затем фильтруют содержимое через бумажный фильтр в колбу для перегонки. Сульфат натрия на фильтре промывают несколькими порциями эфира, который фильтруют в ту же колбу. Эфир отгоняют в токе азота на водяной бане при температуре не выше 50°. Неомыляемый остаток растворяют в абсолютном спирте до получения раствора, содержащего в 1 мл около 8 м. е. витамина А. Измеряют оптическую плотность этого раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 1 см при длинах волн 311; 324,5; 334 нм, применяя в качестве контрольного раствора абсолютный спирт.

Содержание витамина А в международных единицах в 1 г жира (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_{\text{испр}} \cdot Y}{a \cdot 100} \cdot 1850,$$

где $D_{\text{испр.}} = 7 \cdot D_{324,5} - 2,912 \cdot D_{311} - 4,088 \cdot D_{334}$;

D — оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны, указанной снизу справа;

Y — разведение, мл;

a — навеска, г;

1850 — коэффициент перевода, м. е.

Исследования подтвердили возможность использования липидов гидробионтов непищевого значения для получения заменителя рыбьего жира, а также для получения высокоактивных фракций, содержащих исключительно ценные в биологическом отношении высоконенасыщенные высшие жирные кислоты — эйкозатетраеновую, эйкозапентаеновую, докозагексаеновую.

Из гидробионтов непищевого значения можно добывать такие вещества, как микроэлементы и факторы роста, которые уже получают за рубежом из мелких водорослей: миоглобин; аденозинтрифосфат (АТФ) из рыб (до сих пор его получали из мышечной ткани телят). Из различных видов непищевых кишечнорастворимых, моллюсков, иглокожих в настоящее время выделяют мукополисахариды и полисахариды, используемые в химической и фармацевтической промышленности, чистые ферменты, загустители, поверхностно-активные вещества, краски, гормоны и медиаторы, из которых, наибольшее народнохозяйственное и научное значение имеют простагландины (Гандель и др., 1976; Ажгихин, Гандель, 1972).

Простагландины представляют собой особую группу природных биологически активных веществ — ненасыщенных жирных кислот, структура которых включает циклопентановое кольцо. В зависимости от строения пятичленного цикла простагландины делят на группы А, В, Е, F и Д. Они необходимы животным организмам и присутствуют в каждой живой клетке. Особенно высоко их содержание у некоторых обитателей океана. Простагландины группы Е открыты в семенниках камбалы, группы F — в семени кеты, групп Е и F — в семенниках голубого тунца, простагландин Е₂ выделен из слизистой желудочно-кишечного тракта некоторых акул, F_{2α} — из яйцеклеток морского ежа. Наибольшее количество простагландинов и их предшественников содержит коралл *Plexaura homomalla* (около 2,6% сухой массы).

На наличие возможных предшественников простагландинов нами был изучен эндемик Байкала — живородящая рыба голомянка большая, отличающаяся высоким содержанием низкоплавкового высыхающего жира. Эта рыба — наиболее многочисленный обитатель озера: ее общая биомасса составляет свыше 150 тыс. т. Жирность самок, на долю которых приходится около 84% общей численности голомянок, составляет свыше 44%.

Был исследован жир самок голомянки, выловленной в июне 1975 г. и ноябре 1976 г. Рыбу тотчас после отлова помещали в жидкий азот. После оттаивания (0—4°) тело рыб (мягкое, легко изминающееся) превращали в кашицу, к которой добавляли (0,1%) метабисульфита. Кашицу заливали двойным объемом экстрагента (хлороформ — этанол 7:3), перемешивали при барботировании азотом в стеклянном реакторе в течение 2 ч, после чего отстаивали в холодильнике в течение суток. Смесь фильтровали, остаток отжимали в жидкую фракцию присоединяли к фильтрату, который упаривали в вакууме в токе азота до полного удаления органических растворителей. Из 5 кг голомянки большой можно получить 2 кг жира, что составляет 40% от массы рыбы.

К 150 г жира добавляли 185,7 мл 40%-ного раствора едкого кали в метаноле и перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч в токе инертного газа. Метанол отгоняли в вакууме до 1/3 первоначального объема. К остатку прибавляли равный объем воды и смесь экстрагировали эфиром порциями по 1/2 экстрагируемого объема до полного удаления неомыляемых веществ. Остаток после экстрагирования подкисляли 3 Н серной кислотой под слоем эфира в токе азота при охлаждении до рН 3,0 и трижды экстрагировали равным объемом эфира. Объединенные эфирные вытяжки промывали водой, насыщенной эфиром до нейтральной реакции, и сушили безводным сульфатом натрия, который потом отделяли, эфир отгоняли и получали концентрат I ненасыщенных жирных кислот (масса — 125 г, кислотное число 3,45, йодное число 130—145, перекисное число 0,015).

К концентрату I добавляли 625 г мочевины и 1250 мл метанола, смесь нагревали до 45° пока мочевина полностью растворится в токе азота, затем охлаждали до 4° и выдерживали при этой температуре 6 ч. Выпавший осадок отделяли, промывали 500 мл охлажденного метанола и присоединяли его к метанольному раствору кислот. Далее метанол отгоняли в вакууме, а к остатку добавляли 500 мл эфира и промывали водой до полного удаления мочевины.

Эфирный раствор отделяли, сушили безводным сульфатом натрия, удаляли эфир в токе азота. Остаток растворяли в ацетоне (1:10) и перемешивали в токе азота в течение 4 ч при температуре минус 30°. Осадок растворяли в 200 мл ацетона и еще раз перемешивали в токе аргона в течение 4 ч при температуре минус 30°.

Осадок отделяли, ацетоновые растворы объединяли, выпаривали в вакууме в токе азота в течение 4 ч при минус 70°. Осадок отделяли, ацетоновые раствора объединяли, выпаривали в вакууме в токе азота и получали концентрат II ненасыщенных жирных кислот со следующими показателями:

Масса, г	25
Кислотное число	3
Йодное число	185
Перекисное число	0,010
Содержание арахидоновой кислоты, %	70

0.5 мг полученного концентрата арахидоновой кислоты переводили в метиловый эфир и растворяли в петролейном эфире или бензоле. Определяли метиловый эфир с применением газо-жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии на хромато-масс-спектрометре IMS01-SG-2 при следующих условиях (рис. 2 а):

Длина стеклянной колонки, м	2
Внутренний диаметр, мм	2
Неподвижная фаза 5%	SE-30
Хромосорб	WAW
Температура, °С	
инжектора	200
колонки	200
Газ-носитель	Гелий
Давление газа на входе, атм	0,4

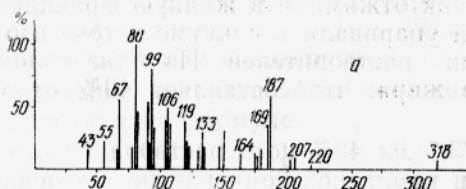
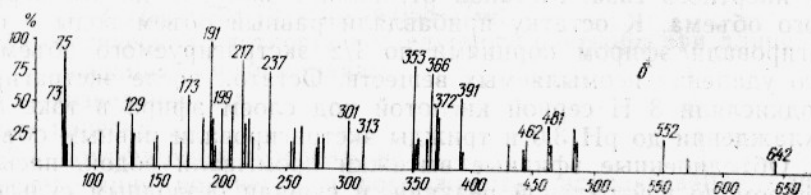


Рис. 2. Масс-спектр метилового эфира арахидоновой кислоты (а) и триметилсилилового производного ПГГ₂ (б).



Условия получения масс-спектра следующие (рис. 2 б):

Длина стеклянной колонки, м	1
Внутренний диаметр, мм	2
Жидкая фаза 3%	OV-17
Носитель	Gas Chrom Q
Температура, °С	
инжектора	270
колонки	215
сепаратора	220
Газ-носитель	Гелий
Скорость газа, мл/мин	60
Ионизирующее напряжение, ЭВ	22

Биосинтез простагландинов осуществляли следующим образом: 1 г концентрата II смешивали с 3 л гомогенизированной в аммиачном буферном растворе рН 8,5 бычьей семенной плазмы и инкубировали аэробно при перемешивании в течение 4 ч при температуре 37°, подкисляли 3 N раствором соляной кислоты до рН 3,5, после чего смесь экстрагировали шестью порциями эфира по 0,5 л. Эфирные экстракты объединяли, промывали водой, насыщенным эфиром, до рН не ниже 5, после чего упаривали в токе азота до сухого состояния. Сухой остаток растворяли в свежеперегнанном этаноле и исследовали.

Простагландины E₂ и F_{2α}, содержащиеся в полученном спиртовом растворе, идентифицируют и выделяют при помощи хроматографии в тонком слое сорбента (силикагель) на пластинках 10×20 см из рас-

чета 3 г силикагеля для приготовления одной пластинки. Подвижными фазами служат следующие системы растворителей: I этилацетат — уксусная кислота — изооктан — вода (110:20:50:100), II этилацетат — бензол — муравьиная кислота (80:20:1). Зоны разделенных веществ на проявленных хроматограммах идентифицировали опрыскиванием 10%-ным спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты с последующим нагреванием при 105—110° в течение 5—7 мин.

Для спектрофотометрического определения к 3,5 мл спиртового раствора, содержащего около 50 мкг простагландина E_2 , прибавляли 1,5 мл 1 Н раствора едкого натра и нагревали при 55° 30 мин. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре, используя для сравнения раствор реактивов, приготовленных в аналогичных условиях с испытуемым раствором. Максимум поглощения наблюдают при 278 нм.

При хромато-масс-спектрометрическом определении 0,25 мг очищенного хроматографически простагландина $F_{2\alpha}$ переводили в триметилсилильное производное (Гандель и др., 1976). Масс-спектрометрическое определение проводили в условиях, указанных выше для метилового эфира арахидоновой кислоты. Ионизирующее напряжение — 22,5 эв. Полученный масс-спектр имеет все характерные ионы, соответствующие триметилсилильному производному простагландина $F_{2\alpha}$.

При биологическом тестировании изолированный рог матки рожавшей крысы, переживающий в модифицированной системе Рингера-Локка, подключают к автоматическому регистратору сократительных функций гладкой мускулатуры. При введении в систему жизнеобеспечения продукта биосинтеза в концентрации 10⁻⁸—10⁻⁹ г/мл регистрируют на ленте кимографа резкое усиление спонтанной активности миометрия, идентичное стандартной активности простагландина E_2 и $F_{2\alpha}$. При такой же концентрации подобной биологической активностью обладает нативный жир голомянки.

ВЫВОДЫ

1. Гидробионты непищевого значения могут служить богатейшим источником ценных биологически активных веществ и полупродуктов.

2. Из гидробионтов непищевого значения можно выделять токсические вещества, которые могут стать основой медицинских и биологических препаратов.

3. Гидробионты непищевого значения — источник биологически активных липидов, играющих важнейшую роль в профилактике и терапии сердечно-сосудистых заболеваний; получать один из них — простагландины можно на основе жира голомянки большой.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Гандель В. Г., Ажгихин И. С., Печенников В. М., Евстигнеева Р. П., Серебренников Н. В., Сарычева И. К., Жильцов Н. З., Голубь В. С., Орлова Г. С., Замуреев В. А. «Фармация», 1976, № 6, с. 18—23.

Ажгихин И. С., Гандель В. Г. Некоторые вопросы биофармации и фармакокинетики. М., 1972, с. 138—141.

Ржавская Ф. М. Жиры рыб и морских млекопитающих. М., 1976, с. 356.

Humm, H. I., Lane, C. E. Bioactive compounds from the sea. New York, 1974, 327 pp.

Ruggieri, G. D. Ann. N.-Y. Acad. Sci., 1975, v. 245, p. 39—56.

Prospects for utilization of non-commercial aquatic species in the national economy

Azhgikhin I. S., Gendel V. G.,
Pechennikov V. M., Serebryannikov N. V.,
Finkel V. V., Zamurenko V. A.

SUMMARY

Problems of utilization of non-commercial aquatic species (poisonous fish, little known species etc.) for medical and veterinary purposes are summarized. They may be used for making preparations containing polyenic acids and their derivatives as well as various toxins for prevention and treatment of cardio-vascular and other diseases, for increasing productivity in cattle-breeding and fur-bearing animal rearing. The example of obtaining highly effective substances (prostaglandines E₂ and F_{2α}) from the oil of *Comephorus baicalensis* (Pall.) is given.