

ИЗУЧЕНИЕ J-АГРЕГАТОВ ПРИРОДНОГО АНТИОКСИДАНТА АСТАКСАНТИНА И ЕГО ЭФИРОВ

Е.А. Куликов¹, И.С. Куликова¹, Е.В. Вязов², Р.Г. Гончарик², А.А. Селищева¹¹ Национальный Исследовательский Центр «Курчатовский институт», Москва, Россия² Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Астаксантин является природным каротиноидом, обладающий антиоксидантной и противовоспалительной активностью, он способен проникать через гематоэнцефалический барьер, сетчатку глаза и встраиваться в клеточную мембрану. Известно, что каротиноиды могут образовывать в смесях воды и органических растворителей (спирта или ацетона) большие агрегаты, которые получили название супрамолекулярных комплексов [1]. Как правило, эти сведения относятся к свободной форме каротиноидов и только для зеаксантина показано образование J-агрегатов из его моно- и диэфиров [2]. Агрегация каротиноидов происходит не только в искусственных системах, но является важным фактором правильного функционирования фотосинтетического аппарата [3]. Изучение агрегации каротиноидов представляет большой интерес, поскольку в зависимости от типа агрегации меняются фотохимические свойства каротиноидов, что может также влиять на их стабильность и биодоступность.

В многочисленных работах для **свободной** (неэтерифицированной) формы астаксантина (рис. 1), как и для других каротиноидов, были получены два типа комплексов (Н и J), которые образуются в разных условиях [4–6]. В литературе практически отсутствуют сведения об образовании агрегатов эфиром астаксантина, содержание которых в стрессированной клетке *N. pluvialis* достигает 80 % от массы всех каротиноидов [7, 8].

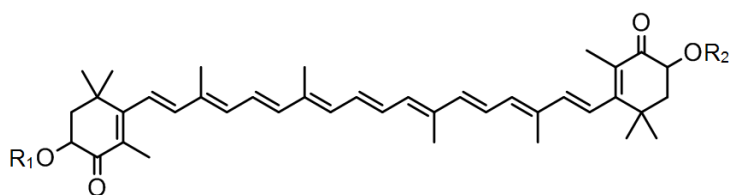


Рисунок 1. Структурные формулы свободной формы ($R_1 = H$, $R_2 = H$), его моно- (R_1 – остаток жирной кислоты, $R_2 = H$) и диэфиров астаксантина (R_1 и R_2 – остаток жирной кислоты).

В растворах с высоким содержанием воды астаксантин образует Н-агрегаты с гипсохромным смещением спектра поглощения (в область меньших длин волн), молекулы располагаются «голова-к-голове» параллельно друг другу в так называемой «card packed» форме и удерживаются водородными связями. Напротив, J-агрегаты образуются в полярном растворителе с меньшим количеством воды и вызывают батохромный сдвиг спектра поглощения (в область больших длин волн). В таком случае молекулы располагаются «голова-к-хвосту», поэтому принято считать, что водородные связи не участвуют в образовании J-агрегатов [9].

В данной работе сначала астаксантин или его эфиры растворяли в смеси ТГФ: MeOH (1:3), в которой образовывались мономеры с максимумом поглощения 480 нм, а затем добавляли воду. При дальнейшей инкубации интенсивность поглощения на 480 нм снижалась, а максимум спектра поглощения каротиноида смещался в область 510–610 нм, что согласно литературным данным [5] говорит об образовании J-агрегатов (рис. 2). В случае свободного астаксантина и его моноэфиров за 1 час происходило смещение на 60–70 нм в область больших длин волн (рис 2А, 2Б). Аналогичный сдвиг для диэфиров наблюдался спустя сутки инкубации.

При изучении влияния содержания ТГФ на скорость агрегации установили, что увеличение доли ТГФ в водно-спиртовой смеси ТГФ: MeOH: 0,7М NaCl с (1:3:10) до (2:3:10) приводило к росту скорости агрегации астаксантина и его эфиров.

Увеличение ионной силы раствора приводило к ускорению агрегации. Так при инкубации свободного астаксантина при 25 °С в смеси ТГФ: MeOH: 0,7М NaCl смещение максимума поглощения происходит значительно быстрее по сравнению с водно-спиртовой смесью, не содержащей соли (данные не приводятся). Агрегация диэфиров без добавления соли не протекает вовсе.

Цель работы – оптимизация условий получения агрегатов эфиров астаксантина и изучение их физико-химических характеристик (размера, спектров поглощения).

В растворах с высоким содержанием воды астаксантин образует Н-агрегаты с гипсохромным смещением спектра поглощения (в область меньших длин волн), молекулы

Увеличение концентрации NaCl с 0.7 до 1.45 М привело к тому, что максимум поглощения свободного астаксантина мгновенно сместился в область 520 нм и 550 нм, моноэфиров – в область 495 нм и 520 нм, а раствор диэфиров стал мутным. В течение суток все три раствора полностью обесцветились, астаксантин выпал в осадок либо образовал масляную фазу (как в случае этерифицированных форм).

Таким образом, увеличение ионной силы значительно ускоряет процесс агрегации, но в то же время ухудшает стабильность полученных растворов, что приводит к быстрому падению оптической плотности.

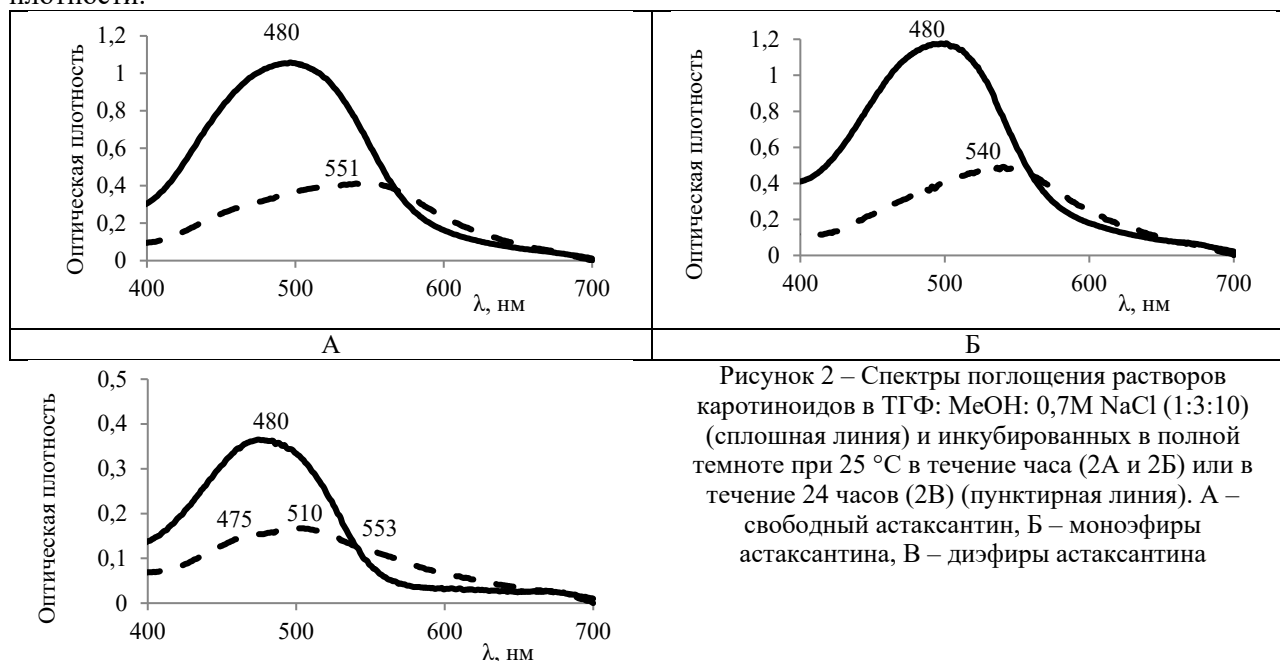


Рисунок 2 – Спектры поглощения растворов каротиноидов в ТГФ: МеОН: 0,7М NaCl (1:3:10) (сплошная линия) и инкубированных в полной темноте при 25 °С в течение часа (2А и 2Б) или в течение 24 часов (2В) (пунктирная линия). А – свободный астаксантин, Б – моноэфиры астаксантина, В – диэфиры астаксантина

Определение размера образовавшихся в растворе J-агрегатов астаксантина и его эфиров после инкубации в среде ТГФ: МеОН: 0,7М NaCl (1:3:10) в течение 24 часов при 4 °С проводилось методом динамического рассеяния света. Данные, полученные этим методом, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Размер J-агрегатов астаксантина и его эфиров при инкубации в среде ТГФ: МеОН: 0,7М NaCl (1:3:10) в течение 24 часов и 40 суток при 4 °С.

Форма каротиноида	Размер частиц, нм		Индекс полидисперсности		Разброс	
	24 часа	40 суток	24 часа	40 суток	24 часа	40 суток
Свободный астаксантин	400±100	600±200	0,534	0,766	0,569	0,654
Моноэфиры астаксантина	900±100	600±200	0,350	0,474	0,600	0,633
Диэфиры астаксантина	2500±200	Расслоение	0,070	–	0,632	–

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для получения агрегатов эфиров астаксантина в данной работе была впервые использована водная смесь органических растворителей ТГФ: МеОН: Н₂ О/0,7М NaCl (1:3:10) и оптимизированы условия получения J-агрегатов моно- и диэфиров астаксантина. При изучении динамики их образования методом спектрофотометрии установили, что скорость образования J-агрегатов значительно вырастает при повышении ионной силы среды, что свидетельствует в пользу гидрофобных сил взаимодействия в агрегатах.

Поскольку в клетках присутствует большое количество различных солей, в первую очередь ацетаты и хлориды, которые добавляют для увеличения накопления астаксантина и его эфиров, то можно предположить, что агрегаты также могут образовываться в клетке и оказывать влияние на её фотохимические свойства.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19–54–04003) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б19РМ-010)

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang C., Berg C.J., Hsu C.C., et al. Characterization of carotenoid aggregates by steady-state optical spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2012, 116(35), 10617–10630. doi: 10.1021/jp3069514
2. Hempel J., Schädle C.N., Leptihn S., et al. Structure related aggregation behavior of carotenoids and carotenoid esters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2016, 317, 161–174. doi: 10.1016/j.jphotochem.2015.10.024
3. Ruban A.V., Horton P., Young A.J. Aggregation of higher plant xanthophylls: differences in absorption spectra and in the dependency on solvent polarity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1993, 21(2–3), 229–234. doi:
4. Köpsel C., Möltgen H., Schuch H., et al. Structure investigations on assembled astaxanthin molecules. *Journal of molecular structure*, 2005, 750(1–3), 109–115. doi: 10.1016/j.molstruc.2005.02.038
5. Giovannetti R., Alibabaei L., Pucciarelli F. Kinetic model for astaxanthin aggregation in water–methanol mixtures. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2009, 73(1), 157–162. doi: 10.1016/j.saa.2009.02.017
6. Buchwald M., Jencks W.P. Optical properties of astaxanthin solutions and aggregates. *Biochemistry*. 1968, 7(2), 834–843. doi: 10.1021/bi00842a042
7. Denery J.R., Dragull K., Tang C.S., Li Q.X. Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Analytica chimica acta*. 2004, 501(2), 175–181. doi: 10.1016/j.aca.2003.09.026
8. Boussiba S., Fan L., Vonshak, A. [36] Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga *Haematococcus pluvialis*. In *Methods in enzymology*. 1992, 213, 386–391. doi: 10.1016/0076-6879(92)13140-S
9. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Carotenoids, vol. 4: natural functions. Basel, Switzerland: Springer Science & Business Media. 2008, 370p.

УДК 576.5

ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ КАК ИНСТРУМЕНТ ПОИСКА МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ОПУХОЛИ: ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ

Д.А. Дидыч, А.И. Кузьмич, В.В. Плешкан, И.В. Алексеенко, Е.Д. Свердлов

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, Россия*

Опухоль представляет из себя многокомпонентную эволюционирующую систему, состоящую из раковых клеток, клеток микроокружения и внеклеточного матрикса. Поэтому свойства опухоли и ее поведение зависят не только от внутренних особенностей раковых клеток, но и от взаимодействий раковых клеток с микроокружением. Открытие иммунных контрольных точек, обеспечивающих иммунносупрессию в опухоли, свидетельствует о важности межклеточных взаимодействий, в отдельных случаях играющих ключевую роль в существовании опухоли. В связи с этим поиск лиганд-рецепторных взаимодействий между раковыми клетками и другими клетками опухоли является начальным этапом в определении потенциальных мишеней для создания противоопухолевых препаратов. Целью данной работы было на основе данных транскриптомов отдельных опухолевых популяций клеток определить потенциальные лиганд-рецепторные взаимодействия между раковыми клетками, иммунными (CD45+) и не иммунными (Pdgfrb+CD45-) клетками стромы в модельных подкожных опухолях СТ26 (колоректальная карцинома) и Pan02 (аденокарцинома поджелудочной железы). На первом этапе путем подкожного введения раковых клеток, стабильно экспрессирующих GFP, были получены опухоли, из которых были приготовлены клеточные суспензии. Опухолевые клетки окрашивали с помощью флуоресцентно меченых антител к общему лейкоцитарному антигену CD45 и к маркеру мезенхимальных клеток Pdgfrb(CD140b) и проводили отбор интересующих популяций клеток с помощью FACS. Из отобранных популяций клеток были выделены образцы тотальных РНК, из которых после удаления рРНК были приготовлены библиотеки кДНК, предназначенные для RNA-seq. Секвенирование проводили на платформе NovaSeq 6000 Illumina. С помощью анализа данных секвенирования были получены транскриптомы популяций раковых клеток, иммунных и не иммунных клеток стромы для обеих исследуемых моделей опухолей. Учитывая клеточную специфичность и уровень экспрессии генов, кодирующих известные лиганды и рецепторы, были определены наиболее выраженные потенциальные межклеточные взаимодействия. В дальнейшем планируется оценить роль отдельных предсказанных взаимодействий в развитии опухолей.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-00-00194 (17-00-00190).