# Пролиферативные и антиоксидантные свойства функционального мясного протеина в клеточной модели эпителия кишечника НТ-29.

Лисицкая К. В., Торкова А. А., Королева О. В., Попов О. В.

*Учреждение Российской Академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН*

Белковые гидролизаты из различного сырья обладают широким спектром функциональных свойств, включая антиоксидантные, цитопротоективные и пролиферативные эффекты in vitro. В международной практике для создания функциональных пищевых продуктов на основе белковых гидролизатов требуется характеристика их биологических активностей на клеточных моделях. Целью данного исследования была оценка пролиферативной и антиоксидантной активности гидролизатов из коллагенсодержащего сырья на клеточной модели эпителия кишечника человека.

В настоящей работе использовали два образца функционального мясного протеина (ФМП), HCP B4 и HCP Premium 150 (Proliver, Бельгия). HCP B4 получен при ферментативной конверсии мясокостного остатка бройлеров, HCP Premium 150 - при микрофильтрации последнего через фильтр с диаметром пор 150 нм. Гидролизаты растворяли в растворе Хэнкса (ПанЭко, Россия) с последующей фильтрацией в стерильных условиях через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США). Из стерильного базового раствора готовили серии разведений с концентрациями 0,01 – 5,0 мг/мл.

Клетки аденокарциномы кишечника человека линии НТ-29 культивировали в среде ИМЕМ с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, добавками гентамицина и глутамина (ПанЭко, Россия) в пластиковых матрацах при 37ºC и 5% CO2 (Nunc, Дания). После достижения монослоя клетки снимали растворами Версена и 0,25% трипсина (1:2), проводили пассаж 100 мкл клеточной суспензии (106 клеток/мл) на 96-луночные планшеты (Nunc, Дания) и инкубировали в термостате в течение 24 ч.

Для определения пролиферативного действия ФМП, в лунки добавляли 100 мкл растворов ФМП с различными концентрациями и инкубировали планшет 24 ч. Затем растворы аспирировали и добавляли в лунки 100 мкл раствора МТТ (0,5 мг/мл, Roth, США). Через 4 ч инкубации в лунки вносили 100 мкл 10% раствора ДДС натрия в 0,01% растворе HCl и определяли оптическую плотность раствора (540/690 нм) на планшетном фотометре Synergy 2 (BioTek, США).

Для определения антиоксидантного действия ФМП, в лунки добавляли 100 мкл растворов ФМП и после 2 ч инкубации вносили по 100 мкл 10 мМ раствора флуоресцентного зонда DCFH-DA (Sigma, США). Планшет инкубировали в течение 30 мин, после чего аспирировали содержимое лунок и добавляли 100 мкл 10 мМ раствора индуктора свободно-радикального окисления ААРН (Sigma, США). Относительную интенсивность флуоресценции (485/528 нм) определяли непосредственно после добавления ААРН и спустя 1 и 2 ч по отношению к контролю. В качестве контроля использовали клетки, которые инкубировали в растворе Хэнкса без добавления ФМП. Для всех концентраций ФМП исследование проводили в трех повторностях, рассчитывали среднее значение и стандартное отклонение.

Исследуемые образцы ФМП не обладали цитотоксическими свойствами в диапазоне концентраций 0,1-5,0 мг/мл. Пролиферативный эффект ФМП наблюдался при концентрациях 0,25-2,5 мг/мл для HCP B4 и 2,5-5,0 мг/мл для HCP Premium 150.

Анализ антиоксидантной активности показал наличие антиоксидантного эффекта HCP Premium 150 при низких концентрациях (0,025-0,1 мг/мл). Однако для HCP B4 не выявлено достоверного антиоксидантного эффекта во всем диапазоне исследованных концентраций. Вместе с тем, оба препарата ФМП в диапазоне концентраций 1,0-2,5 мг/мл обладают прооксидантной активностью.

Сравнение полученных данных показывает, что микрофильтрация ФМП способствует увеличению его антиоксидантной активности, очевидно, за счет снижения массовой доли жира. В последнем случае в условиях экзогенного оксидантного стресса менее выражено накопление продуктов перекисного окисления липидов, обладающих токсическим действием на клетки эпителия кишечника человека.

Частичное удаление анионных пептидов, содержащих остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот, при микрофильтрации приводит к снижению пролиферативного эффекта ФМП, который наблюдается только при 10-кратном увеличении концентрации HCP Premium 150. Интересно отметить, что концентрационный диапазон проявления прооксидантной активности одинаков для обоих препаратов, что может быть обусловлено как эффектом пептидов, содержащих от 5 до 20 аминокислотных остатков, так и небелковыми компонентами ФМП.

Работа выполнена в рамках государственного контракта № 02.522.11.2143 от 01 марта 2011 года «Разработка методов создания функциональных продуктов и кормов для домашних животных из малоценного сырья животного происхождения» в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на