

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, цитопротективные 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), НСР В4 и НСР Premium 150 (Proliver, Бельгия). НСР В4 получен при ферментативной конверсии мясокостного остатка бройлеров, НСР 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 матрицах при 37°C 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 AAPH (Sigma, США). Относительную интенсивность флуоресценции (485/528 нм) определяли непосредственно после добавления AAPH 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 НСР В4 и 2,5-5,0 мг/мл для НСР Premium 150.

Анализ антиоксидантной активности показал наличие антиоксидантного эффекта НСР Premium 150 при низких концентрациях (0,025-0,1 мг/мл). Однако для НСР В4 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 НСР 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