

При люминесцентной микроскопии препаратов культур клеток MDBK и ВНК-21/13-02 отмечается интенсивная люминесценция молекулярных компонентов. Зеленое свечение в большой степени излучает окрашенная флуорохромом ДНК, а оранжево-красное свечение – РНК. На рисунке 3 (А, Б) в экспериментальных образцах клеточного монослоя, окрашенного акридиновым оранжевым, мертвых клеток не выявлено.

Ядра в клетках, выращенных в средах с добавлением цитокинов, имеют ровные контуры, клетки с кариорексисом и кариопикнозом отсутствуют. Клетки с 2 и более ядрами в экспериментальном монослое не выявлены, что свидетельствует о нормальном митозе клеток.

Заключение. Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что оптимальная метаболизмстимулирующая концентрация IL-6 – 30-60 пг/см³, обеспечивающая стимуляцию метаболизма клеток линии MDBK и ВНК – 21/13 – 02 с индексом пролиферации клеток в 1,33 раза и 1,17 раза соответственно по сравнению с контролем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ада Г. Вакцины, вакцинация и иммунный ответ / Г. Ада, А. Рамсей: пер. с англ. – М.: Медицина, 2002. – 344 с.
2. Бельмер С. В. Значение цитокинов в патогенезе воспалительных заболеваний толстой кишки у детей / С.В. Бельмер, А.С. Симбирцев, О.В. Головенко // РМЖ. – 2003. – Т. 11. – № 3. – С. 17-22.
3. Патент RU 2715336 Класс МПК: C12N 5/00 Способ стимуляции метаболизма культур клеток MDBK для репродукции вирусов /Плотникова Э.М., Архарова И.А., Низамов Р.Н., Матвеева Е.Л. - № 2019112375; заявлено 23.04.2019; Бюл. № 6. Оpubл. 26.02.2020.
4. Самуйленко А.Я. Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК /А.Я. Самуйленко, В.М. Попова, И.Н. Матвеева, Л.А. Скороходова // Материалы международной научно-практической конференции. «Современные методы фильтрации в биотехнологии», 5 - 7 декабря, 2012. – Щелково, 2012. – 23 с.
5. Kim S.H. Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF - alpha / S.H. Kim, S.Y. Han, T. Azam et al. // Immunity. – 2005. – Vol. 22. – № 1. – P. 131-142.

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ГИДРОЛИЗАТОВ СЫВОРОТКИ МОЛОКА И МОЛОЗИВА С γ -ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WHEY AND COLOSTRUM HYDROLYZATES COMPLEXES WITH γ -CYCLODEXTRIN

**Е. И. Тарун^{1,2}, П. А. Виноградов^{1,2}, Д. А. Карабун^{1,2}, Т. Н. Головач², Р. В. Романович²
E. I. Tarun^{1,2}, P. A. Vinogradov^{1,2}, D. A. Karabun^{1,2}, T. M. Halavach², R. V. Romanovich²**

¹Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь
kfl@iseu.by, ktarun@tut.by

²Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

¹International Sakharov Environmental Institute of BSU, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

Проведено сравнительное изучение антиоксидантной активности концентрата сывороточного белка молока, нативного молозива, их ультрафильтрованных гидролизатов, а также комплексов ультрафильтратов гидролизатов с γ -циклодекстрином. Получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации всех образцов, из которых графически определены показатели IC₅₀, которые находились в пределах 7,2–103,4 мкг/мл. Комплексы ультрафильтратов гидролизатов с γ -циклодекстрином восстанавливали флуоресценцию флуоресцеина до 88–96 % при концентрации образцов 0,68–0,75 мг/мл.

The comparative study of the antioxidant activity of whey protein concentrate, native colostrum, their ultrafiltered hydrolysates, as well as complexes of ultrafiltered hydrolysates with γ -cyclodextrin was carried out. The dependences of the fluorescence intensity of fluorescein on the logarithm of the concentration of all samples were obtained, from which the IC₅₀ values were graphically determined, which were in the range of 7,2–103,4 μ g/ml. Complexes of ultrafiltrate hydrolysates with γ -cyclodextrin restored fluorescein fluorescence to 88–96 % at a sample concentration of 0,68–0,75 mg/ml.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, нативное молозиво, гидролизованное молозиво, гидролизат молока, циклодекстрин, флуоресцеин.

Keywords: antioxidant activity, native colostrum, hydrolyzed colostrum, whey hydrolyzate, cyclodextrin, fluorescein.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-2-10-14>

Коровье молоко, сыр и кисломолочные продукты являются доступными источниками биологически активных пептидов (БАП), для которых показаны гипотензивный, иммуномодулирующий, антиоксидантный, антимикробный, антимутагенный и др. эффекты [1]. БАП образуются в результате воздействия на белки молока пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта, при технологической обработке очищенными протеазами, а также ферментации молочнокислыми бактериями [2]. После ферментативного гидролиза основных белков-аллергенов молока (β -лактоглобулин, казеин) образуются гипоаллергенные пептиды, что связано с расщеплением участков антигенных детерминант в соответствующих белках [3]. Использование различных протеолитических ферментов и пробиотических микроорганизмов обеспечивает получение гидролизованных и ферментированных белков молока со специфическим белково-пептидным профилем и характерными биологически активными свойствами [4]. [4]. Циклодекстрины (ЦД) представляют собой полимер-гомологический ряд, общая формула – $(C_6H_{10}O_5)_n$. Общим для всех ЦД является наличие циклодекстринового макроцикла. Его структурная единица – это α -D-глюкоза в пиранозной форме, в состав которой входит 3 гидроксильных группы, две из которых находятся внутри кольца и одна – снаружи. β -циклодекстрин содержит 7 остатков глюкозы. Соответственно 7 гидроксильных групп, находящихся на поверхности этого циклического соединения могут служить ловушками свободных радикалов. Использование ЦД в медицине направлено на повышение качества лекарственных препаратов. В таких комплексах наблюдается повышение стабилизации лекарственных средств, улучшение их физико-химических свойств, изменении агрегатного состояния многое другое. ЦД применяются в этом случае или для образования комплексов, или в качестве вспомогательных веществ.

Целью создания комплексов гидролизата белков молока и молозива с β -циклодекстрином являлось устранение горького вкуса гидролизата. Вместе с тем, актуальным представляется изучение влияния комплексообразования на функциональные свойства пептидов, в частности, на антиоксидантную активность гидролизованных белков молока и молозива.

Метод определения антиоксидантной активности (АОА) по отношению к активированным формам кислорода (АФК) основан на измерении интенсивности флуоресценции окисляемого соединения и ее уменьшении под воздействием АФК. В настоящей работе для детектирования свободных радикалов использован флуоресцеин, обладающий высоким коэффициентом экстинкции и близким к 1 квантовым выходом флуоресценции. Генерирование свободных радикалов осуществляли, используя систему Фентона, в которой образуются гидроксильные радикалы при взаимодействии комплекса железа (Fe^{2+}) с этилендиаминтетрауксусной кислотой (EDTA) и пероксида водорода [5]. При взаимодействии флуоресцеина со свободными радикалами происходит тушение его флуоресценции, восстановить которую можно при добавлении в систему веществ, проявляющих антиоксидантные свойства. В качестве таких веществ были взяты 6 образцов: концентрат сывороточного белка молока, нативное молозиво, их ультрафильтрованные гидролизаты, а также комплексы ультрафильтратов гидролизатов с γ -циклодекстрином. В таблице 1 указано содержание сухого вещества и белка в образцах.

Таблица 1 – Перечень образцов молока и молозива

№	Название образца	Краткое название образца	Содержание белка, мг/мл	Содержание сухого вещества, мг/мл
1	Концентрат сывороточного белка молока	КСБ	35,1	50,8
2	Нативное молозиво	М	31,5	48,5
3	Ультрафильтрат гидролизата сывороточного белка молока	ГСБ–УФ	13,7	23,4
4	Ультрафильтрат гидролизата молозива	ГМ–УФ	9,7	22,7
5	Комплекс ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока с циклодекстрином	ГСБ–ЦД	13,7	75,2
6	Комплекс ультрафильтрата гидролизата молозива с циклодекстрином	ГМ–ЦД	9,7	68,0

В работе использовали концентрат сывороточного белка молока и сухое молозиво (образцы предоставлены ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», Россия). Ультрафильтрат гидролизата сывороточного белка молока и молозива получен в НИЛ прикладных проблем биологии (БГУ) с применением протеолитического фермента алкалазы.

Получение ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока и гидролизата молозива:

Готовили 10 % растворы гидролизатов в дистиллированной воде, центрифугировали для осаждения нерасстворимых частиц при 6000 g и температуре 4 °C в течение 30 мин. Полученные супернатанты фракционировали с применением фильтров Spin-X UF Concentrator 20 (Corning, Англия) с разделяющей способностью 10 кДа. Ультрафильтраты гидролизованного и ферментированного молозива представлены фракцией с молекулярной

массой (mg), меньшей или равной 10 кДа. Содержание общего азота в экспериментальных образцах определяли по СТБ ISO 8968–1–2008, массовую долю (м.д.) сухого вещества – по ГОСТ 3626–76 (п. 3).

Приготовление комплексов ультрафильтратов гидролизатов с циклодекстринами:

Ультрафильтраты гидролизатов брали в пропорции с циклодекстрином 5%:3%. К 0,1 г. сухой смеси добавляли 2 мл дистиллированной воды. Для получения однородной суспензии помещали стакан с комплексом гидролизатов с циклодекстринами на водяную баню при температуре 50 °С и перемешивали. Получали раствор комплексов гидролизатов с циклодекстринами с концентрацией 50 мг/мл.

Измерения флуоресценции проводили на флуориметре RF-5301 PC («Shimadzu», Япония). Регистрировали интенсивность флуоресценции на длине волны 514 нм. Длина волны возбуждения – 490 нм.

Для всех образцов получены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина от логарифма концентрации молока и молозива. В таблице 2 представлены основные показатели антиоксидантной активности: A_{\max} – интенсивность флуоресценции, соответствующая максимальному ингибированию свободных радикалов, S_{\max} – концентрация молозива, при которой достигается A_{\max} и IC_{50} – концентрация образца, при которой достигается 50 % ингибирования свободных радикалов.

Таблица 2 – Показатели антиоксидантной активности образцов молока и молозива

№	Название образца	A_{\max} , %	C_{\max} , мг/мл	IC_{50} , мкг/мл сухого вещества	IC_{50} , мкг/мл белка
1	КСБ	71	0,508	149,7	103,4
2	М	78	0,485	94,4	61,3
3	ГСБ–УФ	83	0,234	33,1	19,4
4	ГМ–УФ	86	0,227	29,1	12,4
5	ГСБ–ЦД	88	0,752	61,8	11,3
6	ГМ–ЦД	96	0,68	50,6	7,2
7	ЦД	79	0,5	120,9	

На рисунке 1 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) концентрата сывороточного белка (КСБ) (1), ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока (ГСБ–УФ) (2), комплекса ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока с γ -циклодекстрином (ГСБ–ЦД) (3) и γ -циклодекстрина (ЦД) (4).

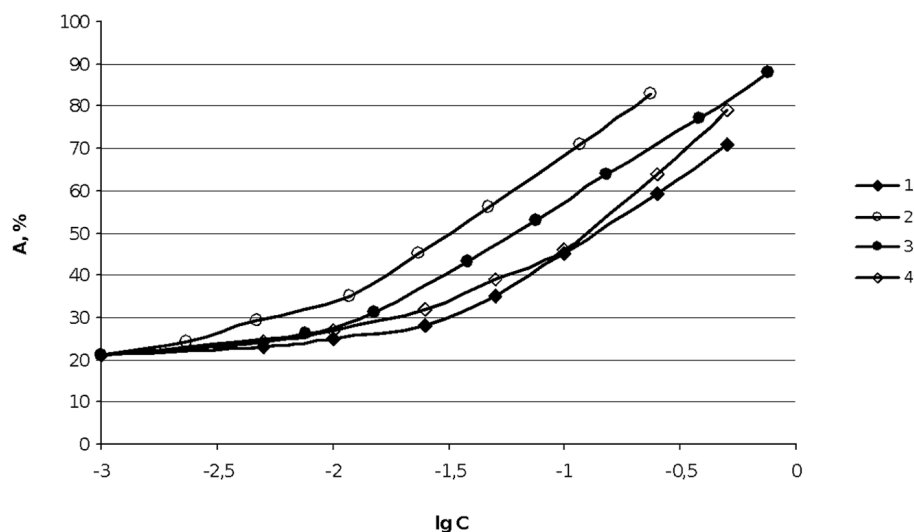


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (A) от логарифма концентрации (C) концентрата сывороточного белка (КСБ) (1), ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока (ГСБ–УФ) (2), комплекса ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока с γ -циклодекстрином (ГСБ–ЦД) (3) и γ -циклодекстрина (ЦД) (4)

Минимальная антиоксидантная активность получена для образца концентрата сывороточного белка (КСБ). Флуоресценция флуоресцеина восстанавливается до 71 % при концентрации 0,508 мг/мл. Также максимальные значения имеют и показатели IC_{50} по сухому веществу (149,7 мкг/мл) и белку (103,4 мкг/мл).

Гидролиз белков молока и их последующая ультрафильтрация приводит к уменьшению высокомолекулярной фракции белка, способствуя повышению антиоксидантной активности. Образец ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока (ГСБ–УФ) восстанавливает флуоресценцию флуоресцеина до 83 % при концентрации 0,234 мг/мл, что на 12 % выше, чем для образца КСБ. Показатели IC_{50} по сухому веществу

(33,1 мкг/мл) и по белку (19,4 мкг/мл) уменьшаются в 4,5/5,3 раза соответственно по сравнению с аналогичными показателями КСБ.

Образец комплекса ультрафильтрата гидролизата сывороточного белка молока с γ -циклодекстрином (ГСБ–ЦД) восстанавливает флуоресценцию флуоресцеина до 88 % при концентрации 0,752 мг/мл. Как видно из рисунка 1, этот образец снижает радикальную активность более эффективно, чем образец КСБ, но менее эффективен по сравнению с образцом ГСБ–УФ. Показатель IC_{50} по сухому веществу (61,8 мкг/мл) в 2,4 раза ниже аналогичного показателя для образца КСБ и в 1,9 раза выше показателя для образца ГСБ–УФ. Однако, показатель IC_{50} по белку (11,3 мкг/мл) уменьшается в 9,2 и 1,7 раза по сравнению с аналогичными показателями для образцов КСБ и ГСБ–УФ соответственно.

γ -Циклодекстрин (ЦД) восстанавливает флуоресценцию флуоресцеина до 79 % при концентрации 0,5 мг/мл, что на 9 % ниже образца ГСБ–ЦД. Показатель IC_{50} по сухому веществу (120,9 мкг/мл) в 2 раза выше аналогичного показателя для образца ГСБ–ЦД. Таким образом, включение циклодекстрина в комплекс с ультрафильтратом гидролизованного сывороточного белка молока повышает его антиоксидантную активность.

На рисунке 2 представлены зависимости интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации (С) молозива (М) (1), ультрафильтрата гидролизата молозива (ГМ–УФ) (2), комплекса ультрафильтрата гидролизата молозива с γ -циклодекстрином (ГМ–ЦД) (3) и γ -циклодекстрина (ЦД) (4).

Образец молозива (М) восстанавливает флуоресценцию флуоресцеина до 78 % при концентрации 0,485 мг/мл, что на 7 % выше, чем для образца КСБ. Показатели IC_{50} по сухому веществу (94,4 мкг/мл) и по белку (61,3 мкг/мл) в 1,6/1,7 раза ниже, чем для образца КСБ, что свидетельствует о более высокой антиоксидантной активности молозива по сравнению с белками молока.

Гидролиз молозива и последующая ультрафильтрация также приводит к повышению антиоксидантной активности за счет уменьшения высокомолекулярной фракции белка. Образец ультрафильтрата гидролизата молозива (ГМ–УФ) восстанавливает флуоресценцию флуоресцеина до 86 %, что на 8 % выше, чем для образца молозива, при более низкой концентрации 0,227 мг/мл. Показатели IC_{50} по сухому веществу (29,1 мкг/мл) и по белку (12,4 мкг/мл) уменьшаются в 3,2/5 раз по сравнению с аналогичными показателями молозива. Кроме того, показатели IC_{50} несколько ниже по сравнению с аналогичными показателями образца ГСБ–УФ, а показатель A_{max} на 3 % выше.

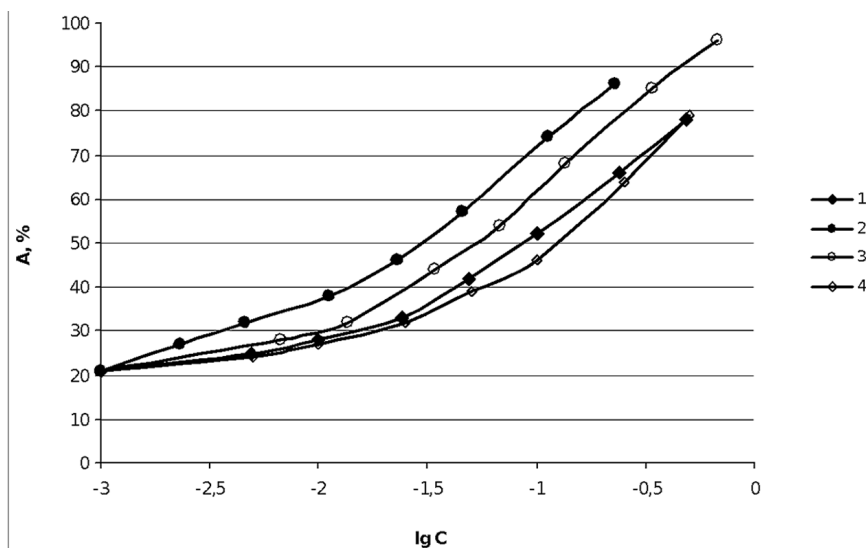


Рисунок 2 – Зависимость интенсивности флуоресценции флуоресцеина (А) от логарифма концентрации (С) молозива (М) (1), ультрафильтрата гидролизата молозива (ГМ–УФ) (2), комплекса ультрафильтрата гидролизата молозива с γ -циклодекстрином (ГМ–ЦД) (3) и γ -циклодекстрина (ЦД) (4)

Образец комплекса ультрафильтрата гидролизата молозива с γ -циклодекстрином (ГМ–ЦД) восстанавливал флуоресценцию флуоресцеина на максимальную величину ($A_{max} = 96\%$) при концентрации 0,68 мг/мл. Как видно из рисунка 2, этот образец снижает радикальную активность более эффективно, чем образец молозива, но менее эффективен по сравнению с образцом ГМ–УФ. Показатель IC_{50} по сухому веществу (50,6 мкг/мл) в 1,9 раза ниже аналогичного показателя для образца молозива и в 1,7 раза выше показателя для образца ГМ–УФ. Однако, показатель IC_{50} по белку (7,2 мкг/мл) уменьшается в 8,5 и 1,7 раза по сравнению с аналогичными показателями для образцов молозива и ГМ–УФ соответственно. Данный образец так же показывает более высокую антиоксидантную активность по сравнению с аналогичным образцом для белков молока (ГСБ–ЦД). Его показатель A_{max} на 8 % выше, а показатель IC_{50} по белку в 1,6 раз ниже. Необходимо отметить увеличение АОА комплекса по отношению к γ -циклодектрину. Повышается показатель A_{max} на 17 % и показатель IC_{50} по сухому веществу уменьшается в 2,4 раза по сравнению с аналогичным показателем для образца γ -циклодекстрина.

Таким образом показано повышение антиоксидантной активности благодаря гидролизу и последующей ультрафильтрации молока и молозива за счет обогащения низкомолекулярной фракции. Показатели A_{max} образцов

ультрафильтратов гидролизованного молока и молозива возрастали на 8–12%, а показатели IC_{50} по сухому веществу уменьшались в 3,2/4,5 раза, а по белку в 5/5,3 раза по сравнению с образцами КСБ и молозива.

Образцы комплексов белков молока и молозива с γ -циклодекстринами показывали повышение АОА по сравнению с исходными образцами КСБ и молозива, а также с γ -циклодекстрином. Показатели A_{max} образцов комплексов ГСБ–ЦД и ГМ–ЦД увеличивались на 17/18 % по сравнению с образцами КСБ и молозива и на 9/17 % по сравнению с γ -циклодекстрином. Показатели IC_{50} комплексов ГСБ–ЦД и ГМ–ЦД по сухому веществу уменьшались в 2,4/1,9 раз, а по белку в 9,2/8,5 раза по сравнению с исходными образцами КСБ и молозива. Также они уменьшались в 2/2,4 раза и по сравнению с IC_{50} циклодекстрина.

Сравнение комплексов белков молока и молозива с γ -циклодекстринами с ультрафильтратами гидролизатов молока (ГСБ–УФ) и молозива (ГМ–УФ) показывает повышение показателя A_{max} на 5–10 % при максимальных концентрациях и снижение показателей IC_{50} по белку в 1,7 раза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wada, Y. Bioactive peptides derived from human milk proteins – mechanisms of action / Y. Wada, B. Lönnerdal // J. Nutr. Biochem. 2014. V. 25, № 5. P. 503–514.
2. Mohanty, D. et al. Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food / D. Mohanty // Int. J. Food Prop. 2016. V. 19. P. 837–846.
3. Tsaouri, S. Cow's milk allergenicity / S. Tsaouri, K. Douros, K.N. Priftis // Endocr. Metab. Immune. 2014. V. 14, № 1. P. 16–26.
4. Madureira, A.R. Invited review: physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins / A.R. Madureira [et al.] // J. Dairy Sci. 2010. V. 93, № 2. P. 437–455.
5. Тарун Е.И. Антиоксидантная активность гексагидрохинолонов / Е.И. Тарун, А.В. Данькова, А.Н. Пырко // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. – 2019. – № 2. – С. 77–83.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДА ЦИНКА НА ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЕ ИНСУЛИНА

EFFECT OF ZINC CHLORIDE ON INSULIN FIBRILLATION

В. В. Саган^{1,2}, Н. В. Богданова^{1,2}

V. Sagan^{1,2}, N. Bogdanova^{1,2}

¹Белорусский государственный университет, БГУ

²Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, г. Минск, Республика Беларусь
kbb@iseu.by, sagan_lera@mail.ru

¹Belarusian State University, BSU

²International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

Выявлено влияние температурного и механического фактора на фибриллообразование инсулина. Установлено, что в процессе инкубации инсулина в течении 30 часов концентрация фибрилл возрастает по сравнению с контролем. Показано, что инкубирование инсулина с хлоридом цинка приводило к снижению фибриллообразования инсулина.

The influence of temperature and mechanical factors on insulin fibril formation was revealed. It was found that during the incubation of insulin for 30 hours, the concentration of fibrils increases compared to the control. It was shown that the incubation of insulin with zinc chloride led to a decrease in insulin fibril formation.

Ключевые слова: инсулин, хлорид цинка, фибриллообразование, сахарный диабет.

Keywords: insulin, zinc chloride, fibril formation, diabetes mellitus.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2022-2-14-17>

Благодаря экспериментальным исследованиям процессов денатурации и ренатурации белков и условиях *in vitro*, известно, что вся информация о пространственной структуре белков заключена в их аминокислотной последовательности. Некоторые белки обладают способностью после денатурации спонтанно восстанавливать свою уникальную конформацию и функцию. Во время нарушения пространственной укладки белков, могут образоваться жесткие агрегаты – амилоиды. Образование амилоидов (амилоидогенез) представляет собой стадийный процесс, в основе которого лежит изменение пространственной формы белка. Для этого белковая молекула