ТЕХНОЛОГИЯ ОБРАБОТКИ ГИДРОБИОНТОВ

УДК 594–1.05

Е.П. Караулова¹, Х.Д. Юн², Дж.Г. Ким³, С.Х. Пак³, Т.Н. Слущкая¹,
Е.В. Якуш^{1*}

¹ Тихоокеанский научно-исследовательский рыбохозяйственный центр,
690091, г. Владивосток, пер. Шевченко, 4;

² Биологическая пищевая компания,
120-12, г. Косон, Республика Корея;

³ Кенгсанский национальный университет,
38, г. Тхоньян, Республика Корея

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТКАНЕЙ
ДВУСТВОРЧАТЫХ МОЛЛЮСКОВ

Исследована биологическая активность тканей и ферментных гидролизатов трех видов двустворчатых моллюсков: корбикула японская *Corbicula japonica*, мерценария *Mercenaria mercenaria*, анадара Броутона *Anadara broughtonii*. Установлено, что при ферментативном гидролизе исследуемых мягких тканей двустворчатых моллюсков, происходит достоверное увеличение величины антирадикальной активности для всех исследуемых образцов: в 8,0 раза для *C. japonica*, в 3,0 раза для *M. mercenaria* и в 2,5 раза для *A. broughtonii*. Максимальная антитромбоцитарная активность была определена для гидролизата мягких тканей *C. japonica* при концентрации белкового гидролизата 10 мг/мл и составила 0,0823 ед. Ангиотензин-ингибирующей активностью обладали только гидролизаты *M. mercenaria* в концентрации гидролизата 10–100 мг/мл. Максимальная активность в отношении альфа-амилазы и альфа-гликозидазы наблюдалась для гидролизатов мягких тканей *M. mercenaria* и составила соответственно 7,5 и 7,2 % при концентрации гидролизата 1 мкг/мл. Гепатопротекторная активность, измеренная по выживаемости гепатоцитов НерG2, проявлялась при концентрации гидролизата корбикулы и мерценарии от 100 мкг/мл, анадары — от 200 мкг/мл.

Ключевые слова: двустворчатые моллюски, антиоксидантная активность, ангиотензин-ингибирующая активность, гепатопротекторная активность, биологическая активность.

DOI: 10.26428/1606-9919-2018-195-253-264.

Karaulova E.P., Yoon H.D., Kim J.G., Park S.H., Slutskaya T.N., Yakush E.V. Study on biological activity of tissues from bivalve mollusks // Izv. TINRO. — 2018. — Vol. 195. — P. 253–264.

* Караулова Екатерина Павловна, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, e-mail: karaulova2002@yandex.ru; Юн Ху Донг, доктор философии, директор, e-mail: hdyoon@gmail.com; Ким Джонг Гун, профессор, e-mail: kimjeonggyun@nate.com; Пак Си Хан, доктор философии, заведующая отделом, e-mail: hyangi51@hanmail.com; Слущкая Татьяна Ноевна, доктор технических наук, профессор, заведующая отделом, e-mail: tinro@tinro-center.ru; Якуш Евгений Валентинович, кандидат химических наук, доцент, заместитель директора, e-mail: evyakush@mail.ru.

Karaulova Ekaterina P., Ph.D., senior researcher, e-mail: karaulova2002@yandex.ru; Yoon Ho Dong, Ph.D., director, e-mail: hdyoon@gmail.com; Kim Jeong Gyun, professor, e-mail: kimjeonggyun@nate.com; Park Si Hyang, Ph.D., head of department, e-mail: hyangi51@hanmail.com; Slutskaya Tatiana N., D.Sc., professor, head of department, e-mail: tinro@tinro-center.ru; Yakush Eugeny V., Ph.D., deputy director, e-mail: evyakush@mail.ru.

Biological activity of tissues and enzyme hydrolyzates is investigated for three species of bivalve mollusks: *Corbicula japonica*, *Mercenaria mercenaria*, and *Anadara broughtonii*. Antiradical activity of all samples has increased significantly during their enzymatic hydrolysis: in eight times for *C. japonica*, in three times for *M. mercenaria*, and in 2.5 times for *A. broughtonii*. The highest anti-trombotic activity (0.0823 units) is found for the hydrolyzate of *C. japonica* in concentration of 10 mg/mL. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity is found only for the hydrolyzate of *M. mercenaria* in concentration of 10–100 mg/mL. The maximum inhibitory activity for alpha-amylase and alpha-glycosidase (7.5 and 7.2 %, respectively) is observed for the hydrolyzate of *M. mercenaria* in concentration 1 mg/mL. Hepatoprotective activity, measured by survival rate of HepG2 hepatocytes, is detected for the hydrolyzate of tissues for all species in weak concentrations: 0.1 mg/mL for *C. japonica* and *M. mercenaria* and 0.2 mg/mL for *A. broughtonii*.

Key words: bivalve mollusk, antiradical activity, angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity, hepatoprotective activity, biological activity.

Введение

Ткани гидробионтов характеризуются высоким содержанием веществ, обладающих широким спектром биологической активности и могут быть использованы в пищевой технологии как основа для получения биологически активных добавок (БАД). Тем не менее широкое применение и производство БАД из сырья морского происхождения ограничивается их высокой себестоимостью. Одним из путей снижения себестоимости БАД является комплексное и рациональное использование всех органов и тканей морских гидробионтов, в том числе создание технологий получения белковых гидролизатов и концентратов.

Полученные ранее результаты (Оводова и др., 1990; Аюшин и др., 1997; Купина и др., 2015) свидетельствуют о том, что двустворчатые моллюски являются источником полноценного белка и биологически активных компонентов, могут использоваться в качестве функционального продукта питания. Установлено, что гидролиз белков приводит к достоверному повышению антирадикальной активности (АРА) за счет увеличения количества биологически активных пептидов с молекулярной массой от 1 до 10 кДа (Караулова и др., 2015, 2017). Природные биоантиоксиданты представляют собой широкий класс химических соединений, которые, помимо прямого антирадикального действия, могут проявлять противоопухолевую, антиишемическую, противовоспалительную, гепатопротекторную активности. Из литературы известно, что пептиды проявляют антиканцерогенные (Leng et al., 2005) и иммуномодулирующие свойства (Chalamaiah et al., 2012), снижают уровень холестерина (Chijimatsu et al., 2009), проявляют гепатопротекторный эффект (Hsu et al., 2010). Были выделены пептиды, ингибирующие действие ангиотензинпревращающего фермента (АПФ), который обладает сосудосуживающим действием и повышает риск заболевания атеросклерозом, инсультом, инфарктом миокарда (FitzGerald, Meisel, 2000). Показано, что пептиды группы казеин-макропептидов обладают антитромбоцитарным эффектом и подавляют агрегацию тромбоцитов (Dunehoo et al., 2006). В литературе описаны положительные результаты испытаний антирадикальных препаратов в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний (Воронина, 2001; Evran et al., 2014; Sui, Gao, 2014). Установлено, что комплекс пептидных фракций нормализует метаболизм в клетках и регулирует функции печени, снижает токсический эффект лекарств и алкоголя, проявляя гепатопротекторные свойства (Degirolamo et al., 2015; Turcic, Stambuk, 2015). Пептиды используются в профилактике сахарного диабета за счет ингибирования ферментов, участвующих в расщеплении углеводов, — альфа-амилазы и альфа-глюкозидазы, что достоверно приводит к снижению уровня глюкозы в крови (Tundis et al., 2011). Клинические исследования показали, что применение в комплексной терапии сахарного диабета антиоксидантов пептидной природы способствует снижению выраженности микро- и макроангиопатий, улучшает показатели гликемического профиля (Bolignano 2017; Souza, 2017). Имеются данные о возможности лечения сахарного диабета 2-го типа с использованием биоактивных

пептидов из морских организмов (Xia et al., 2017). Многообразие природных форм антиоксидантов, их фармакологических и биологических эффектов может сыграть решающую роль в снижении риска развития раковых и сердечно-сосудистых заболеваний, болезней Альцгеймера и Паркинсона, артритов, диабета, замедлить процессы старения организма.

В этом контексте закономерным представляется предположение о наличии не только антирадикальной, но и других типов биологической активности в тканях исследуемых гидробионтов после ферментативного гидролиза. В данной работе мы продолжили исследование изучение биологической активности гидролизатов гидробионтов с целью оценить их гепатопротекторную, антидиабетическую, ангиотензин-ингибирующую и антитромбоцитарную активность.

Материалы и методы

В качестве сырья для исследований использовали мягкие ткани и внутрисполостную жидкость двустворчатых моллюсков: корбикула японская *Corbicula japonica*, мерценария *Mercenaria mercenaria*, анадара Броутона *Anadara broughtonii*.

Для получения гидролизатов использовали ферментный препарат «Protamex» (Biosis, Busan, South Korea). Гидролиз гомогенатов проводили при температуре 50 °C в течение 3 ч при pH 7. Гидролиз останавливали нагреванием смеси до 80 °C в течение 15 мин. Для оценки биологической активности использовали лиофильно высушенные гидролизаты.

Суммарную антирадикальную активность определяли с использованием 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) (Molyneux, 2004) с регистрацией оптической плотности раствора при 517 нм на планшетном спектрофотометре Polarstar Omega.

Антирадикальную активность рассчитывали по формуле

$$APA = \frac{A_c - A_s}{A_c} \cdot 100 \%,$$

где A_c — величина оптической плотности раствора сравнения; A_s — оптическая плотность исследуемого раствора.

Величину антирадикальной активности рассчитывали как параметр EC 50 % — количество исследуемого вещества, необходимое для 50 %-ного восстановления радикала ДФПГ.

Гепатопротекторную активность оценивали *in vitro* с применением культуры клеток человеческих гепатоцитов HepG2. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (Sigma, USA), содержащей 10 % бычьей сыворотки (Biochrom KG, Germany), с добавлением пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мг/мл) при 37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Для воспроизведения модельной патологии печени применялся 10 %-ный этиловый спирт. Оценку выживаемости клеток проводили с использованием системы подсчета клеток Cell Counting Kit-8 (ССК-8, Dojindo, Кумамото, Япония).

Антитромбоцитарную активность определяли в соответствии с методом Chang с соавторами (2005) по реакции тромбина с фибриногеном. Антитромбоцитарный эффект оценивали по величине снижения оптической плотности раствора при 655 нм на микропланшетном сканере (Ultraspec 2100 Pro, Amersham Biosciences). За единицу активности принимали количество фермента, необходимого для уменьшения оптической плотности на 0,1 за 60,0 мин реакции.

Ингибирующую активность в отношении альфа-амилазы определяли спектрофотометрическим методом Hansawasdi с соавторами (2000) по скорости ферментативного гидролиза крахмала. Оптическую плотность измеряли при 595 нм с использованием микропланшетного сканера (Ultraspec 2100 Pro, Amersham Biosciences). Ингибирующую активность рассчитывали по формуле

$$\text{активность } \alpha\text{-амилазы} = \frac{((A_c+) - (A_c-)) - (A_s - A_b)}{(A_c+) - (A_c-)} \cdot 100 \%,$$

где активность α -амилазы — ингибирующая активность в отношении альфа-амилазы; (A_c+) — 100 %-ная оптическая плотность раствора субстрата с панкреатической ами-

лазой (Sigma, ЕС 3.2.1.1); (A_c) — 0 %-ная оптическая плотность раствора субстрата без фермента; A_s — оптическая плотность исследуемого образца; A_b — оптическая плотность раствора сравнения.

Определение ингибирующей активности в отношении альфа-гликозидазы проводили с использованием метода Apostolidis с соавторами (2006) по изменению количества нитрофенил-глюкопиринозида. Оптическую плотность измеряли при длине волны 400 нм с использованием планшетного сканера (Ultraspec 2100 Pro, Amersham Biosciences) и рассчитывали степень ингибирования активности фермента по формуле

$$\text{активность } \alpha\text{-гликозидазы} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \cdot 100 \%,$$

где A_c — величина оптической плотности раствора сравнения; A_s — оптическая плотность исследуемого раствора.

Оценку ингибирующей активности в отношении ангиотензинпревращающего фермента проводили в соответствии с методом, описанным Wanasundara с соавторами (2002), основанным на количественном измерении гиппуровой кислоты, выделяющейся под действием АПФ. Супернатант, содержащий гиппуровую кислоту, анализировали на колонке Bondclone C18 (Agilent system, Agilent, Germany), УФ-детектор с длиной волны 228 нм. Показатель ингибирования активности фермента рассчитывали по формуле

$$\text{Ингибирование АПФ} = \frac{C_c - C_s}{C_c} \cdot 100 \%,$$

где C_c — содержание гиппуровой кислоты в контрольном образце; C_s — содержание гиппуровой кислоты в исследуемом образце.

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Statistica 7. Эксперименты повторялись трижды, а эксперименты с использованием клеточных культур шестикратно. Результаты представлены в виде среднего значения со среднеквадратическим отклонением. Значения и различия между значениями с доверительной вероятностью $P \geq 0,95$ считались статистически достоверными.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследования общей антирадикальной активности водорастворимых компонентов и гидролизатов мягких тканей трех видов исследуемых двустворчатых моллюсков показывают (табл. 1), что в водных фракциях тканей корбикулы японской антирадикальная активность максимальная, ЕС 50 % составляет 8,7 мг. Для мерценарии и анадары величина АРА была значительно ниже, ЕС 50 % составила соответственно 43,6 и 59,6 мг сухого вещества. После ферментативного гидролиза исследуемых мягких тканей в описанных условиях наблюдалось достоверное ($P = 0,99$) увеличение антирадикальной активности для всех исследуемых образцов: антирадикальная активность водорастворимой фракции корбикулы возросла в 8,0 раза, мерценарии и анадары — соответственно в 3,0 и 2,5 раза.

Таблица 1
Антирадикальная активность водорастворимых компонентов и гидролизатов тканей двустворчатых моллюсков

Table 1
Antiradical activity of water-soluble components and hydrolysates of tissues from bivalve molluscs

Образец	Антирадикальная активность, ЕС 50 %, мг сухого вещества	
	Водорастворимая фракция*	Гидролизат
<i>C. japonica</i>	8,7 ± 1,2	1,10 ± 0,08
<i>M. mercenaria</i>	43,6 ± 2,1	13,80 ± 1,20
<i>A. broughtonii</i>	59,6 ± 1,8	22,70 ± 0,90

* Исследовали всю водорастворимую фракцию измельченных мягких тканей, включая внутрислоистную жидкость моллюсков.

Полученные результаты не противоречат литературным данным о том, что при гидролизе происходит высвобождение биологически активных пептидов, сопровождающееся ростом антирадикальной активности (You et al., 2009).

Дальнейшие исследования спектра биологической активности проводили с использованием лиофильно высушенных гидролизатов мягких тканей двустворчатых моллюсков. Наши исследования были сфокусированы на антигипертензивном, анти-тромбоцитарном, антидиабетическом и гепатопротекторном действии.

Величину возможного антитромбоцитарного эффекта оценивали по снижению количества растворимой формы фибрина при реакции взаимодействия фибриногена с тромбином. Тромбин является слабым протеолитическим ферментом. Он действует на фибриноген, отщепляя от молекулы фибриногена низкомолекулярные пептиды. В результате образуются одиночные молекулы фибрин-мономеров. Затем мономеры фибрина объединяются между собой с формированием нитей фибрина и образованием кровяного сгустка. Действие антитромбоцитарных препаратов направлено на снижение способности тромбина гидролизовать фибриноген. Величины антитромбоцитарной активности исследуемых гидролизатов приведены в табл. 2. В качестве сравнения использовали растительный протеолитический фермент папаин (Sigma, ЕС 3.4.22.2), антикоагулянтные (фибринолитические) свойства которого проявляются за счет способности активировать плазминоген с дальнейшим расщеплением фибрина.

Таблица 2

Антитромбоцитарная активность гидролизатов тканей исследуемых двустворчатых моллюсков

Table 2

Antitrombotic activity of hydrolysates of tissue from bivalve mollusks		
Образец	Концентрация исследуемого гидролизата, мг/мл	Антитромбоцитарная активность, ед.
Папаин (контроль)	1	0,0117 ± 0,0031
	10	0,0173 ± 0,0068
<i>C. japonica</i>	1	Н/о
	10	0,0823 ± 0,0118
<i>A. broughtonii</i>	1	Н/о
	10	Н/о
<i>M. mercenaria</i>	1	Н/о
	10	0,0471 ± 0,0280

Примечание. Здесь и далее Н/о — активность отсутствует.

Как видно из данных табл. 2, гидролизаты исследуемых тканей корбикулы и мерценарии обладают антитромбоцитарной активностью. Максимальная антитромбоцитарная активность характерна для гидролизата мягких тканей корбикулы при концентрации белкового гидролизата 10 мг/мл — 0,0823 ед., что в 4,5 раза выше анти-тромбоцитарной активности папаина. Антитромбоцитарная активность гидролизатов мягких тканей мерценарии в концентрации 10 мг/мл превышала активность папаина в 2 раза. Стоит отметить, что в концентрациях исследуемых гидролизатов 1 мг/мл анти-тромбоцитарная активность не проявлялась. При этом для папаина наблюдали проявление антитромбоцитарной активности и при низких концентрациях. Вероятно, это связано с составом водорастворимых компонентов, проявляющих фибринолитические свойства. Возможно, в случае гидролизатов тканей гидробионтов антитромбоцитарный эффект начинает проявляться после достижения определенного уровня концентрации биологически активных компонентов. В гидролизатах тканей анадары антитромбоцитарной активности обнаружено не было.

Еще одним фактором, влияющим на риск возникновения сердечно-сосудистых заболеваний, является активность ангиотензинпревращающего фермента. Повышение активности АПФ приводит к увеличению артериального давления за счет расщепления ангиотензина I до ангиотензина II и деградации сосудорасширяющего пептида бра-

дикинина. Способность гидролизатов тканей двустворчатых моллюсков ингибировать АПФ показана в табл. 3.

Таблица 3

Ингибирующая активность в отношении ангиотензинпревращающего фермента гидролизатов тканей двустворчатых моллюсков

Table 3

Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates of tissue from bivalve mollusks

Образец	Концентрация гидролизата, мг/мл	Ангиотензин-ингибирующая активность, %
<i>C. japonica</i>	1	H/o
	10	H/o
	100	H/o
<i>A. broughtonii</i>	1	H/o
	10	H/o
	100	H/o
<i>M. mercenaria</i>	1	H/o
	10	12,4 ± 2,1
	100	34,3 ± 3,6

Как видно из данных табл. 3, только гидролизаты мерценарии обладают АПФ-ингибирующей активностью в концентрации 10–100 мг/мл. При более низкой концентрации гидролизата АПФ-ингибирующая активность не наблюдалась. АПФ-ингибирующая активность, в отличие от АРА, существенно зависит от аминокислотной последовательности, длины цепи и гидрофобности пептидов, с чем, вероятно, и связано отсутствие АПФ-ингибирующей активности в гидролизатах корбикулы, обладающих, как установлено, высокой антирадикальной активностью.

В литературе встречаются сообщения об использовании пептидов в качестве ингибиторов ферментов, участвующих в расщеплении углеводов, — альфа-амилазы и альфа-глюкозидазы, что достоверно приводит к снижению уровня глюкозы в крови (Tundis et al., 2011). При исследовании потенциальной возможности гидролизатов моллюсков снижать активности гипогликемических ферментов в качестве сравнения использовали акарбозу, которая применяется в мировой клинической медицине как гипогликемическое лекарственное средство, тормозящее переваривание и всасывание углеводов в тонком кишечнике.

Как видно из полученных данных (табл. 4), гидролизаты проявляют ингибирующую активность в отношении гипогликемических ферментов, которая возрастает с увеличением концентрации. Максимальная активность в отношении амилазы и гликозидазы установлена для гидролизатов мягких тканей мерценарии и составила соответственно 7,5 и 7,2 % при концентрации 1 мкг/мл. Эта величина сопоставима с активностью акарбозы при концентрации 0,1 мкг/мл. Акарбоза является синтетическим гипогликемическим средством и назначается пациентам в тех случаях, когда изменение режима питания или другие гипогликемические средства не обеспечивают эффективного контроля над их состоянием. Поэтому сопоставимость ингибирующей активности гидролизата мерценарии с величиной активности достаточно сильного лекарственного средства, хотя и в разных дозировках активного вещества, является значимой и предполагает проведение дополнительных исследований. Ингибирующая альфа-амилазная и альфа-глюкозидазная активности гидролизатов корбикулы ниже активности гидролизатов мерценарии, а в случае ингибирования альфа-амилазы даже ниже ингибирующей активности гидролизата мягких тканей анадары при концентрации 1 мкг/мл.

Гепатопротекторная активность гидролизатов мягких тканей корбикулы японской, мерценарии и анадары была исследована *in vitro* с применением клеточной культуры человеческих гепатоцитов HepG2 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Гепатопротекторную активность определяли, оценивая жизнеспособность клеток в образцах, обработанных 10 %-ным этанолом, в сравнении с контрольной группой (рис. 1).

Таблица 4

Альфа-амилазная и альфа-гликозидазная ингибирующая активность гидролизатов тканей исследуемых гидробионтов

Table 4

Inhibitory activity for alpha-amylase and alpha-glycosidase of hydrolysates of tissue from bivalve mollusks

Исследуемый образец	Гидролизат, мкг/мл	Активность, % ингибирования фермента	
		α -амилаза	α -гликозидаза
Акарбоза (контроль)	0,1	$11,5 \pm 2,3$	$7,8 \pm 1,9$
	1,0	$44,7 \pm 2,9$	$46,5 \pm 3,2$
<i>C. japonica</i>	1,0	$0,5 \pm 0,4$	$5,6 \pm 0,4$
	10,0	$13,0 \pm 0,2$	$15,0 \pm 0,8$
<i>A. broughtonii</i>	1,0	$6,7 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,9$
	10,0	$10,3 \pm 1,0$	$10,1 \pm 1,3$
<i>M. mercenaria</i>	1,0	$7,5 \pm 0,9$	$7,2 \pm 1,1$
	10,0	$12,6 \pm 1,3$	$18,2 \pm 1,4$

Рис. 1. Гепатопротекторная активность гидролизатов тканей двустворчатых моллюсков. Для оценки активности использовали величину выживаемости клеток человеческих гепатоцитов HepG2

Fig. 1. Hepatoprotective activity of hydrolysates of tissues from bivalve mollusks (calculated from survival of human hepatocyte HepG2 cells, %)

При внесении в культуру клеток 10 % этанола (отрицательный контроль) выживаемость клеток достоверно ($P = 0,99$) снизилась на 33,6 %. Введение гидролизата корбикулы с концентрацией от 0,01 до 1,0 мкг/мл, гидролизата анадары с концентрацией от 0,01 до 100,0 мкг/мл или гидролизата мерценарии с концентрацией от 0,01 до 10,0 мкг/мл в культуру клеток не привело к росту выживаемости последних на фоне действия 10 %-ного этанола. При внесении 10 и 100 мкг гидролизата корбикулы выживаемость клеток повысилась на 1–2 % по сравнению с отрицательным контролем. Но различия были достоверными ($P = 0,95$) только для эксперимента с внесением 100 мкг гидролизата. Внесение гидролизата корбикулы в количестве 200 мкг/мл привело к увеличению выживаемости клеток на 16 % по сравнению с отрицательным контролем с высокой степенью достоверности эксперимента ($P = 0,99$). Внесение гидролизата анадары привело к достоверным различиям ($P = 0,95$) в количестве выживших клеток при концентрации гидролизата 200 мкг/мл. В присутствии гидролизата мерценарии в

концентрации 10, 100 и 200 мкг/мл выживаемость клеток составила 68,9, 70,5 и 72,6 %, что соответствовало достаточному и высокому уровню достоверности эксперимента ($P = 0,95$ и $0,99$).

Сравнение гепатопротекторной активности гидролизатов тканей двустворчатых моллюсков с антирадикальной активностью не позволяет сделать однозначных выводов о взаимосвязи процессов свободнорадикального окисления и гепатопротекторного защитного механизма. Как видно на рис. 1, при внесении в систему гидролизатов корбикулы и мерценарии в количестве 100 мкг/мл степень выживаемости клеток была примерно одинакова и составила 70 %. При увеличении количества вносимого гидролизата корбикулы в два раза (200 мкг/мл) степень выживаемости гепатоцитов возросла на 12 %, при увеличении количества вносимого гидролизата мерценарии до 200 мкг/мл полученные значения практически не изменились. Возможно, в случае гидролизата тканей мерценарии гепатозащитный эффект обусловлен только одним фактором, например, исключительно антирадикальной активностью, тогда как при использовании белков и пептидов корбикулы проявляется совокупность гепатозащитных механизмов, связанных со структурой и строением веществ белкового происхождения, входящих в состав гидролизата.

Заключение

Изучение спектра биологической активности (рис. 2) показало, что гидролизаты исследуемых тканей двустворчатых моллюсков обладают различными типами биологической активности. Гидролизаты тканей корбикулы и мерценарии обладают анти-тромбоцитарной активностью. Максимальная антитромбоцитарная активность была определена для гидролизата мягких тканей корбикулы при концентрации гидролизата 10 мг/мл и составила 0,0823 ед., что в 4,5 раза выше антитромбоцитарной активности протеолитического фермента папаина.

Рис. 2. Распределение спектра биологической активности в исследуемых гидролизатах тканей двустворчатых моллюсков: *прямая линия* — активность альфа-амилазы; *пунктирная* — активность альфа-гликозидазы

Fig. 2. Spectrum of biological activity in hydrolysates of tissues from bivalve mollusks: *solid line* — alpha-amylase activity; *dotted line* — alpha-glycosidase activity

Ангиотензин-ингибирующей активностью характеризуются только гидролизаты мерценарии. Величина АПФ-ингибирующей активности гидролизата мерценарии со-

ставила $12,4 \pm 2,1$ и $34,3 \pm 3,6$ % при концентрации гидролизата соответственно 10 и 100 мг/мл. Это согласуется с литературными данными об АПФ-ингибирующей активности пептидов, выделенных из природных источников (Hartmann, Meisel, 2007). Эти пептиды считаются безопасными в сравнении с синтетическими препаратами, чаще всего расщепляются в желудочно-кишечном тракте человека, не вызывая побочных реакций, и могут быть использованы для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний (Je et al., 2009).

Максимальная активность в отношении альфа-амилазы и альфа-гликозидазы установлена для гидролизатов мягких тканей мерцанарии и составила соответственно 7,5 и 7,2 % при концентрации гидролизата 1 мкг/мл. Уровень ингибирующей гипогликемической активности гидролизата мерцанарии сопоставим с величиной активности лекарственного препарата акарбоза, что является значимым показателем и обосновывает перспективность проведения дальнейших исследований в этой области.

Наличие гепатопротекторной активности определено для всех исследуемых гидролизатов. Для гидролизатов корбикулы и мерцанарии гепатопротекторный эффект проявлялся при концентрации гидролизата 10 мкг/мл, для анадары различия в степени выживаемости клеток по сравнению с отрицательным контролем становились достоверными при внесении 200 мкг/мл гидролизата. Максимальная степень выживаемости клеток была определена в случае применения гидролизата корбикулы в концентрации 200 мкг/мл и составила 82,3 %, что на 16,0 % выше, чем в эксперименте с воздействием 10 %-ного этанола, но на 18,0 % ниже интактных клеток.

Разнообразие форм биологической активности, выявленных в моллюсках, свидетельствует о высоком потенциале этих объектов для разработки БАД и продуктов функционального питания. Полученные результаты являются основанием для исследования комплексного воздействия биологически активных компонентов разной направленности на физиологический статус организма.

Список литературы

- Аюшин Н.Б., Петрова И.П., Эпштейн Л.М. Таурин и карнозин в тканях тихоокеанских моллюсков // Вопр. питания. — 1997. — № 6. — С. 6–8.
- Воронина Т.А. Антиоксидант мексидол. Основные нейрорпсихотропные эффекты и механизм действия // Психофармакол. биол. наркол. — 2001. — Т. 1, № 1. — С. 2–12.
- Караулова Е.П., Чепкасова А.И. Пептиды морских объектов как потенциальный источник природных антиоксидантов // Изв. ТИНРО. — 2017. — Т. 189. — С. 192–203.
- Караулова Е.П., Чепкасова А.И., Слуцкая Т.Н. и др. Антирадикальный эффект низкомолекулярных пептидов экстрактов и гидролизатов тканей гидробионтов // Изв. ТИНРО. — 2015. — Т. 182. — С. 269–276.
- Купина Н.М. Основные результаты исследования двусторчатых моллюсков прибрежной зоны Японского моря // Изв. ТИНРО. — 2015. — Т. 182. — С. 249–257.
- Оводова Р.Г., Молчанова В.И., Михайская Л.В., Оводов Ю.С. Общая характеристика биогликанов-иммуномодуляторов из беспозвоночных Японского моря // Химия природ. соединений. — 1990. — № 6. — С. 738–742.
- Apostolidis E., Kwon Y.I., Shetty K. Potential of cranberry-based herbal synergies for diabetes and hypertension management // Asia Pac. J. Clin. Nutr. — 2006. — Vol. 15, № 3. — P. 433–441.
- Bolignano D., Cernaro V., Gembillo G., Baggetta R., Buemi M., D'Arrigo G. Antioxidant agents for delaying diabetic kidney disease progression: A systematic review and meta-analysis // PLoS One. — 2017. — Vol. 12, № 6: e0178699. DOI: 10.1371/journal.pone.0178699.
- Chalamaiah M., Dinesh Kumar B., Hemalatha R., Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review // Food Chem. — 2012. — Vol. 135, Iss. 4. — P. 3020–3038. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.100.
- Chang G.T., Min S.Y., Kim J.H., Kim S.H., Kim J.K., Kim C.H. Anti-thrombic activity of Korean herbal medicine, Dae-Jo-Whan and its herbs // Vasc. Pharmacol. — 2005. — Vol. 43, Iss. 4. — P. 283–288. DOI: 10.1016/j.vph.2005.08.014.
- Chijimatsu T., Tatsuguchi I., Oda H., Mochizuki S. A Freshwater clam (*Corbicula fluminea*) extract reduces cholesterol level and hepatic lipids in normal rats and xenobiotics-induced hypercholesterolemic rats // J. Agric. Food Chem. — 2009. — Vol. 57, Iss. 8. — P. 3108–3112. DOI: 10.1021/jf803308h.

DeGirolamo C., Modica S., Vacca M. et al. Prevention of spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice by intestinal-specific farnesoid X receptor reactivation // *Hepatol.ogy.* — 2015. — Vol. 61, Iss. 1. — P. 161–170. DOI: 10.1002/hep.27274.

Dunehoo A.L., Anderson M., Majumdar S. et al. Cell adhesion molecules for targeted drug delivery // *J. Pharm. Sci.* — 2006. — Vol. 95, Iss. 9. — P. 1856–1872. DOI: 10.1002/jps.20676.

Evran B., Karpuzoğlu H., Develi S. et al. Effects of carnosine on prooxidant-antioxidant status in heart tissue, plasma and erythrocytes of rats with isoproterenol-induced myocardial infarction // *Pharmacol. Rep.* — 2014. — Vol. 66, Iss. 1. — P. 81–86. DOI: 10.1016/j.pharep.2013.08.008.

FitzGerald R.J., Meisel H. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme // *Br. J. Nutr.* — 2000. — Vol. 84, Suppl. 1. — P. 33–37.

Hansawasdi C., Kawabata J., Kasai T. Alpha-amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* — 2000. — Vol. 64, Iss. 5. — P. 1041–1043. DOI: 10.1271/bbb.64.1041.

Hartmann R., Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications // *Curr. Opin. Biotechnol.* — 2007. — Vol. 18, Iss. 2. — P. 163–169. DOI: 10.1016/j.cobio.2007.01.013.

Hsu C.L., Hsu C.C., Yen G.C. Hepatoprotection by freshwater clam extract against CCl₄-induced hepatic damage in rats // *Am. J. Chin. Med.* — 2010. — Vol. 38, № 5. — P. 881–894. DOI: 10.1142/S0192415X10008329.

Je J.Y., Lee K.H., Lee M.H., Ahn C.B. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis // *Food Res. Int.* — 2009. — Vol. 42, Iss. 9. — P. 1266–1272.

Wanasundara P.K., Ross A.R.S., Amarowicz R. et al. Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma // *J. Agric. Food Chem.* — 2002. — Vol. 50, № 24. — P. 6981–6988.

Leng B., Liu X.D., Chen Q.X. Inhibitory effects of anticancer peptide from *Mercenaria* on the BGC-823 cells and several enzymes // *FEBS Lett.* — 2005. — Vol. 579, № 5. — P. 1187–1190. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.12.089.

Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity // *Songklanakarin J. Sci. Technol.* — 2004. — Vol. 26, Iss. 2. — P. 211–219.

Souza S.R.G., Miranda Neto M.H., Martins Perles J.V.C. et al. Antioxidant Effects of the Quercetin in the Jejunal Myenteric Innervation of Diabetic Rats : *Front. Med. (Lausanne).* — 2017. — Vol. 4. — 8 p. DOI: 10.3389/fmed.2017.00008.

Sui X., Gao C. Huperzine A ameliorates damage induced by acute myocardial infarction in rats through antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory mechanisms // *Int. J. Mol. Med.* — 2014. — Vol. 33, Iss. 1. — P. 227–233. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1546.

Tundis R., Loizzo M.R., Menichini F. et al. Comparative study on the chemical composition, antioxidant properties and hypoglycaemic activities of two *Capsicum annuum* L. cultivars (*Acuminatum* small and *Cerasiferum*) // *Plant Foods Hum. Nutr.* — 2011. — Vol. 66, № 3. — P. 261–269. DOI: 10.1007/s11130-011-0248-y.

Turcic P., Stambuk N., Konjevoda P. et al. Modulation of γ_2 -MSH hepatoprotection by anti-sense peptides and melanocortin subtype 3 and 4 receptor antagonists // *Med. Chem.* — 2015. — Vol. 11, Iss. 3. — P. 286–295. DOI: 10.2174/1573406410666140914161421.

Xia E.Q., Zhu S.S., He M.J. et al. Marine Peptides as Potential Agents for the Management of Type 2 Diabetes Mellitus-A Prospect // *Mar. Drugs.* — 2017. — Vol. 15, № 4. DOI: 10.3390/md15040088.

You L., Zhao M., Cui C. et al. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates // *Innovative Food Science and Emerging Technologies.* — 2009. — Vol. 10(2). — P. 235–240.

References

Ayushin, N.B., Petrova, I.P., and Epshtein, L.M., Taurine and carnosine in tissues of Pacific mollusks, *Vopr. Pitaniya*, 1997, no. 6, pp. 6–8.

Voronina, T.A., Antioxidant Mexidol. The basic neuropsychotropic effects and mechanism of action, *Psychopharmakol. Biol. Narkol.*, 2001, vol. 1, no. 1, pp. 2–12.

Karaulova, E.P. and Chepkasova, A.I., Peptides of marine animals as a potential source of natural antioxidants, *Izv. Tikhookean. Nauchno-Issled. Inst. Rybn. Khoz. Okeanogr.*, 2017, vol. 189, pp. 192–203.

Karaulova, E.P., Chepkasova, A.I., Slutskaya, T.N., Shulgina, L.V., and Yakush, E.V., Anti-radical effect of low-molecular peptides in extracts and hydrolyzates from tissues of water organisms, *Izv. Tikhookean. Nauchno-Issled. Inst. Rybn. Khoz. Okeanogr.*, 2015, vol. 182, pp. 269–276.

- Kupina, N.M.**, The main results of the study of bivalve mollusks in the coastal zone of the Japan Sea, *Izv. Tikhookean. Nauchno-Issled. Inst. Rybn. Khoz. Okeanogr.*, 2015, vol. 182, pp. 249–257.
- Ovodova, R.G., Molchanova, V.I., Mikeiskaya, L.V., and Ovodov, Yu.S.**, General characteristics of immunomodulator bioglycans from invertebrates of the Sea of Japan, *Chem. Nat. Compd.*, 1990, no. 6, pp. 738–742.
- Apostolidis, E., Kwon, Y.I., and Shetty, K.**, Potential of cranberry-based herbal synergies for diabetes and hypertension management, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 2006, vol. 15, no. 3, pp. 433–441.
- Bolignano, D., Cernaro, V., Gembillo, G., Baggetta, R., Buemi, M., and D'Arrigo, G.**, Antioxidant agents for delaying diabetic kidney disease progression: A systematic review and meta-analysis, *PLoS One*, 2017, vol. 12, no. 6, art. ID e0178699. doi 10.1371/journal.pone.0178699
- Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., and Jyothirmayi, T.**, Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review, *Food Chem.*, 2012, vol. 135, no. 4, pp. 3020–3038. doi 10.1016/j.foodchem.2012.06.100
- Chang, G.T., Min, S.Y., Kim, J.H., Kim, S.H., Kim, J.K., and Kim, C.H.**, Anti-thrombic activity of Korean herbal medicine, Dae-Jo-Whan and its herbs, *Vasc. Pharmacol.*, 2005, vol. 43, no. 4, pp. 283–288. doi 10.1016/j.vph.2005.08.014
- Chijimatsu, T., Tatsuguchi, I., Oda, H., and Mochizuki, S.**, A freshwater clam (*Corbicula fluminea*) extract reduces cholesterol level and hepatic lipids in normal rats and xenobiotics-induced hypercholesterolemic rats, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, vol. 57, no. 8, pp. 3108–3112. doi 10.1021/jf803308h
- Degriolamo, C., Modica, S., Vacca, M., Di Tullio, G., Morgano, A., D'Orazio, A., Kannisto, K., Parini, P., and Moschetta, A.**, Prevention of spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice by intestinal-specific farnesoid X receptor reactivation, *Hepatology*, 2015, vol. 61, no. 1, pp. 161–170. doi 10.1002/hep.27274
- Dunehoo, A.L., Anderson, M., Majumdar, S., Kobayashi, N., Berkland, C., and Siahaan, T.J.**, Cell adhesion molecules for targeted drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, 2006, vol. 95, no. 9, pp. 1856–1872. doi 10.1002/jps.20676
- Evran, B., Karpuzoğlu, H., Develi, S., Kalaz, E.B., Soluk-Tekkeşin, M., Olgaç, V., Doğru-Abbasoğlu, S., and Uysal, M.**, Effects of carnosine on prooxidant-antioxidant status in heart tissue, plasma and erythrocytes of rats with isoproterenol-induced myocardial infarction, *Pharmacol. Rep.*, 2014, vol. 66, no. 1, pp. 81–86. doi 10.1016/j.pharep.2013.08.008
- FitzGerald, R.J. and Meisel, H.**, Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme, *Br. J. Nutr.*, 2000, vol. 84, suppl. 1, pp. 33–37.
- Hansawasdi, C., Kawabata, J., and Kasai, T.**, Alpha-amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 2000, vol. 64, no. 5, pp. 1041–1043. doi 10.1271/bbb.64.1041
- Hartmann, R. and Meisel, H.**, Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, vol. 18, no. 2, pp. 163–169. doi 10.1016/j.copbio.2007.01.013
- Hsu, C.L., Hsu, C.C., and Yen, G.C.**, Hepatoprotection by freshwater clam extract against CCl₄-induced hepatic damage in rats, *Am. J. Chin. Med.*, 2010, vol. 38, no. 5, pp. 881–894. doi 10.1142/S0192415X10008329
- Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., and Ahn, C.B.**, Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis, *Food Res. Int.*, 2009, vol. 42, no. 9, pp. 1266–1272.
- Wanasundara, P.K., Ross, A.R.S., Amarowicz, R., Ambrose, S.J., Pegg, R.B., and Shand, P.J.**, Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, vol. 50, no. 24, pp. 6981–6988.
- Leng, B., Liu, X.D., and Chen, Q.X.**, Inhibitory effects of anticancer peptide from *Mercenaria* on the BGC-823 cells and several enzymes, *FEBS Lett.*, 2005, vol. 579, no. 5, pp. 1187–1190. doi 10.1016/j.febslet.2004.12.089
- Molyneux, P.**, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 2004, vol. 26, no. 2, pp. 211–219.
- Souza, S.R.G., Miranda Neto, M.H., Martins Perles, J.V.C., Vieira Frez, F.C., Zignani, I., Ramalho, F.V., Hermes-Uliana, C., Bossolani, G.D., and Zanoni, J.N.**, Antioxidant effects of the quercetin in the jejunal myenteric innervation of diabetic rats, *Front. Med. (Lausanne)*, 2017, vol. 4. doi 10.3389/fmed.2017.00008
- Sui, X. and Gao, C.**, Huperzine A ameliorates damage induced by acute myocardial infarction in rats through antioxidant, anti-apoptotic and anti-inflammatory mechanisms, *Int. J. Mol. Med.*, 2014, vol. 33, no. 1, pp. 227–233. doi 10.3892/ijmm.2013.1546

Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., Bonesi, M., Conforti, F., Statti, G., De Luca, D., de Cindio B., and Menichini, F., Comparative study on the chemical composition, antioxidant properties and hypoglycaemic activities of two *Capsicum annuum* L. cultivars (Acuminatum small and Cerasiferum), *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2011, vol. 66, no. 3, pp. 261–269. doi 10.1007/s11130-011-0248-y

Turcic, P., Stambuk, N., Konjevoda, P., Kelava, T., Gabricevic, M., Stojkovic, R., Aralica, G., Modulation of γ_2 -MSH hepatoprotection by antisense peptides and melanocortin subtype 3 and 4 receptor antagonists, *Med. Chem.*, 2015, vol. 11, no. 3, pp. 286–295. doi 10.2174/1573406410666140914161421

Xia, E.Q., Zhu, S.S., He, M.J., Luo, F., Fu, C.Z., and Zou, T.B., Marine peptides as potential agents for the management of type 2 diabetes mellitus-A prospect, *Mar. Drugs*, 2017, vol. 15, no. 4. doi 10.3390/md15040088

You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., and Yang, B., Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates, *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, 2009, vol. 10, no. 2, pp. 235–240.

Поступила в редакцию 27.07.2018 г.

После доработки 6.08.2018 г.

Принята к публикации 11.10.2018 г.