УДК 57.021
DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.19–24

Є. Кир'яченко, студ., Т. Галенова, канд. біол. наук, О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

АНАЛІЗ СЛИЗУ САДОВОГО РАВЛИКА (*Helix aspersa Muller*) НА ПРИСУТНІСТЬ ПОТЕНЦІЙНИХ ЕФЕКТОРІВ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ

Нині існує багато підходів до створення нових лікарських препаратів, однак жоден із них не може замінити важливу роль природних продуктів у відкритті й розробці ліків. Природна сировина залишається надзвичайно важливим джерелом лікарських засобів. Багато біологічно активних молекул природного походження вже знайшли безпосереднє лікарське застосування, інші можуть служити хімічними моделями або шаблонами для проєктування та синтезу нових фармацевтичних агентів. Слиз равликів уже багато років привертає увагу науковців, як джерело природних біологічно активних речовин. Компоненти слизу равликів неодноразово досліджено на антимікробну, антиоксидантну, протизапальну і протиракову активності. У цій роботі досліджено біологічні ефекти компонентів слизу садового равлика Helix aspersa, поширеного на теренах України. Результати досліджень довели присутність білкових молекул, серед яких частина мала виражений протеолітичний потенціал зі специфічністю до желатину, колагену та фібриногену. Після додавання слизу до плазми крові його складові ініціювали утворення активного тромбіну, а також подовжували час зсідання плазми у коагуляційному тесті АЧТЧ. Крім того, компоненти слизу H. aspersa посилювали ефект індуктора агрегації тромбоцитів й інгібували їхню дезагрегацію. Доведено, що компоненти слизу H. aspersa не мали цитотоксичного ефекту. Отримані результати вказують на перспективність і важливість подальших експериментів із вивчення окремих білкових фракцій слизу з метою ідентифікації окремих біологічно активних молекул, що відповідають за прояв показаних ефектів. Детальний аналіз складу та вивчення властивостей слизу равликів слугуватиме підґрунтям для отримання потенційно нових речовин із цільовими активностями і їхнього подальшого застосування в різних сферах промисловості, включаючи фармацевтичну.

Ключові слова: равлик, слиз, протеолітична активність, система гемостазу, хронометричні тести, гемолітична активність.

Вступ. Протягом століть м'ясо равликів, через його вишукані смакові властивості, а також поживну цінність, використовували в їжу. Однак равлики також користуються підвищеним попитом у фармації та косметології, оскільки є відмінною сировиною біологічно активних речовин. Равлики здатні виробляти в'язко-еластичну речовину, яка називається слизом, що має адгезивні, зволожувальні, захисні та репаративні властивості й виконує різноманітні функції, включаючи полегшення руху по землі, спілкування та неспецифічну, захисну реакцію на фізичне або хімічне подразнення [1, 2]. Слиз равликів є багатим джерелом біологічно активних природних речовин, що вже давно ввійшли до складу ряду косметичних засобів, призначених для догляду за шкірою та для лікування шкірних захворювань, наприклад, ран, опіків, рубців, кератозу, псоріазу та вугрів [1, 3]. Більше того, слиз слимаків добре відомий своїми антивіковими властивостями, а останнім часом його компоненти широко досліджують щодо антибактеріальної активності [4, 5].

Зважаючи на те, що територія України має сприятливі кліматичні умови для вирощування їстівних равликів і беручи до уваги високий попит на цю сировину на світовому ринку, не дивно, що в Україні активно формується нова галузь тваринництва – равликівництво. У зв'язку з популяризацією вирощування равликів актуальним наразі є пошук і розвиток сфер застосування продуктів їхньої переробки. Так, сьогодні українські фермери активно вирощують равликів видів *Helix aspersa Muller* та *Helix aspersa Maxima*, експортуючи близько 400 т сировини до країн Європи щорічно, а отже ці види, а точніше продукти їхньої життєдіяльності, зокрема слиз і продукти переробки їхньої неїстівної частини (мушлі), є перспективною сировиною, що відповідає ключовим вимогам біотехнологічного виробництва – доступність і вартість.

Helix aspersa та *Cornu aspersum* – дві альтернативні назви одного і того самого виду равликів. Таксономічно правильна назва – *C. aspersum*, але попередня назва *H. aspersa* використовується ширше. Ми провели аналіз літературних джерел і даних мережі інтернет щодо потенційних цільових активностей слизу равликів *Helix aspersa Muller* та *Helix aspersa Maxima* та їх найближчих таксономічно-споріднених видів. Згідно з результатами кількох нещодавніх досліджень, слиз равликів виду *Helix aspersa* містить ряд природних речовин, що мають виражені корисні та лікувальні властивості для шкіри людини – алантоїн і гліколеву кислоту [6]. Також із слизу равлика *H. aspersa* виділено кілька фракцій пептидів, що мали антибактеріальні [7, 8] й антиоксидантні [9] властивості. Так показано, що компоненти слизу *H. aspersa* демонстрували ефективну антибактеріальну дію щодо двох різних штамів *Pseudomonas aeruginosa* [3]. Антимікробні пептиди, що були ідентифіковані та виділені зі слизу *H. aspersa* – це мітимацин-AF [3] та гемоціанін β c-HaH [3]. Ще два глікозильовані пептиди, що були виділені зі слизу *H. aspersa*, демонстрували інгібуючий ефект щодо росту *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli* та *Helicobacter pylori* [5]. Серед цільових молекул особливу увагу заслуговують ті, що відповідають за реалізацію антиоксидантних ефектів. Оскільки равлики *H. aspersa* мешкають у природному середовищі, їхній секрет має добре розвинену систему антиоксидантного захисту, що включає ферментативну і неферментативну ланки [10, 11]. Установлено A. Brieva та співавторами [12], що слиз *H. aspersa* містить ферменти із супероксиддисмутазною та глутатіон-трансферазною активностями. Також із слизу видів *H. aspersa* та *H. pomatia* виділено декілька пептидів [5] та глікопротеїдів [13], що мали виражений антиоксидантний потенціал; антиоксиданті властивості слизу також пояснюють наявністю алантоїну [14].

Показано, що екстракти з тканин *H. aspersa Müller* мають виражену протипухлинну активність, що була доведена експериментами на клітинах раку молочної залози (Hs578T) [15]. Гемоціаніни, отримані з *H. aspersa Müller* та *H. lucorum*, і структурна субодиниця гемоціаніну *H. aspersa Müller* знижували життєздатність клітин раку сечового міхура (T-24 та CAL-29) [16]. Більше того, гемоціаніни, виділені з *H. aspersa Müller*, знижували життєздатність ракових клітин яєчників (FraWü), ракових клітин простати (DU-145), клітин гострого моноцитарного лейкозу (THP-1), клітин лімфоми Буркітта (Daudi) та ракових клітин гліоми (LN-18). В експериментах *in vitro* на культурах фібробластів, виявлено, що екстракт з *Helix aspersa* не мав цитотоксичності, захищав клітини від апоптозу і, що важливо, суттєво індукував проліферацію та міграцію

© Кир'яченко Є., Галенова Т., Савчук О., 2021

клітин за допомогою прямих і непрямих механізмів, що спостерігаються за умов ранозаживлення [17]. Указані ефекти були пов'язані з морфологічними змінами, реорганізацією цитоскелета та вивільненням цитокінів.

Отже, зауважимо таке: хоча равликовий слиз нині є інгредієнтом декількох косметичних і парафармацевтичних продуктів, дослідження щодо характеристики його хімічного складу та біологічних ефектів його компонентів лише набувають популярності. Беручи до уваги перспективність указаної сировини як потужного джерела біологічно активних речовин, метою цієї роботи було проведення попереднього аналізу слизу *H. aspersa* щодо присутності компонентів із потенційною ефекторною функцією відносно системи гемостазу.

Матеріали та методи. У дослідах використовували статевозрілих особин виду *H. aspersa* (n = 50) вирощених на равликовій фермі "Вілла Греція" (фермерське господарство "Здравлик", с. Гречане, Петриківський р-н, Дніпропетровська обл., Україна). Слиз равликів отримували працівники ферми за їхньою власною технологією "Здравлик-муцин". Чисту сировину (без додавання води чи інших розчинників) фільтрували, після чого ліофільно висушували (Telstar LyoQuest). Сухий матеріал зберігали при 4 °С. Ліофілізований секрет перед використанням розчиняли з розрахунку 5 мг сухої речовини на 1 мл 50 мМ Tpic-HCl буфера (pH 7,4), що містив 0,13 М NaCl. З метою відокремлення нерозчинних компонентів суспензію центрифугували при 3000 g протягом 5 хв. Концентрацію білка у супернатанті визначали за методом Бредфорд [18]. Білково-пептидний склад слизу досліджували методом диск-електрофорезу у 10%-му поліакриламідному гелі згідно з описаною методикою [19]. Ензим-електрофорез проводили відповідно до методики [20]. Розділяючий гель полімеризували за присутності желатину, колагену та фібриногену з розрахунку 1 мг відповідного субстратного білка на 1 мл розділяючого гелю. Аналіз одержаних електрофореграм здійснювали з використанням програми TotalLab 2.04. Представлені електрофореграми є типовими для серії повторних дослідів.

Гемолітичну активність компонентів слизу *H. aspersa* досліджували в умовах *in vitro* за раніше розробленим методом [21]. Для цього експерименту використовували свіжоприготовлену 2%-ву (об./об.) суспензію еритроцитів кроля в Na-фосфатному буфері, pH 7,2. Різну кількість білкового матеріалу слизу *H. aspersa* додавали до суспензії еритроцитів (кінцеві концентрації загального білка складали – 100; 50; 20 і 5 мкг на 1 мл суспензії клітин) та інкубували за ±37 °С протягом 30 хв. Після інкубації всі зразки центрифугували протягом 6 хв при 2500 g. Супернатанти використовували для визначення вільного гемоглобіну, що з'являвся в розчині за умов лізису клітин. Вимірювання проводили при довжині хвилі 541 нм (μQuant, BioTek Instruments, США). У дослідженні використано два контролі: негативний контроль – суспензія еритроцитів, яка містила лише Na-фосфатний буфер, pH 7,2, та позитивний контроль – суспензія клітин, що містила 1%-й тритон X-100. Оптичні показники позитивного контролю використовували як значення, що характеризує кількість вивільненого гемоглобіну за умови 100%-го лізису клітин.

Протеолітичну активність визначали за здатністю гідролізувати амідний зв'язок у складі таких синтетичних хромогенних субстратів: Phe-Pip-Arg-pNA (S_{2238}, субстрат до тромбіну), Val-Leu-Lys-pNA (S_{2251}, субстрат до плазміну), Ile-Glu-Gly-Arg-pNA (S_{2222}, субстрат до фактору Xa), pyroGlu-Pro-Arg-pNA (S_{2366}, субстрат до активованого протеїну С) [22]. Реакцію проводили в лунках 96-лункового мікропланшету. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища складав 250 мкл. У ході дослідження до 0,05 М Tpic-HCl буфера, pH 7,4, додавали зразок слизу *H. aspersa*, з вмістом загального білка – 20 мкг. Після 5 хв інкубації за 37 °С реакцію ініціювали додаванням відповідного специфічного хромогенного субстрату, кінцева концентрація кожного з них становила 0,3 мМ. Контрольний зразок включав ті самі компоненти, але замість відповідних фракцій секрету містив рівний об'єм 50 мМ Tpic-HCl буфера, pH 7,4. Інкубацію проводили за 37 °С протягом 120 хв. Оптичну щільність проб визначали через рівні проміжки часу при довжині хвилі 405 нм, використовуючи мікропланшеточний спектрофотометр (μQuant, BioTek Instruments, США).

Для вивчення здатності компонентів слизу *H. aspersa* активувати певні проферменти системи гемостазу, використовували інкубаційне середовище аналогічного складу як описано вище, куди крім досліджуваних зразків також вносили 20 мкл плазми крові кроля. Реакцію ініціювали додаванням відповідного хромогенного субстрату з кінцевою концентрацією 0,3 мМ. Контрольний зразок включав ті самі компоненти, але замість досліджуваних зразків секрету містив рівний об'єм 50 мМ Tpic-HCl буфера, pH 7,4. За динамікою розщеплення хромогенних субстратів слідкували за тотожних умов, описаних вище. Аналізуючи потенційний ефект компонентів слизу *H. aspersa* на проензими плазми, отримані результати обчислювали таким чином: значення оптичної щільності проб у експерименті щодо дослідження прямої гідролітичної дії компонентів секрету, віднімали від відповідних значень проб у експерименті з додаванням до інкубаційного середовища плазми. Така маніпуляція дозволила виокремити активність активних ензимів плазми, що потенційно могли утворитися внаслідок дії компонентів секрету на відповідні проензими.

Потенційні ефекти компонентів слизу на час зсідання плазми крові досліджували у хронометричних тестах: "тромбіновий час" (ТЧ), "протромбіновий час" (ПЧ) та "активований частковий тромбопластиновий час" (АЧТЧ) з використанням готових реактивів відповідних комерційних наборів (Ренам, РФ) [22]. У кюветі коагулометра змішували 45 мкл плазми крові кроля та 5 мкл зразка слизу *H. aspersa* з вмістом білка 20 мкг. Для визначення ТЧ до суміші вносили 50 мкл розчину тромбіну з активністю 3 МО/мл; для визначення ПЧ – 100 мкл тромбопластин-кальцієвої суміші; для визначення АЧТЧ – 50 мкл АЧТЧ-реагенту з подальшим додаванням 50 мкл розчину 0,025 М $CaCl_2$. Час зсідання в секундах фіксували на коагулометричному аналізаторі (Rayto RT-2201C, Китай).

Агрегацію тромбоцитів досліджували впродовж перших 3 годин після забору крові на фотооптичному агрегометрі АТ-02 (Medtech, Росія) за методикою описаною раніше [22]. Плазму, збагачену тромбоцитами (ПЗТ), з вмістом клітин 230–250 тис. на 1 мкл інкубували зі зразками слизу *H. aspersa* (кінцеві концентрації загального білка становили: 50; 35; 25 і 15 мкг на 1 мл ПЗТ) протягом 2 хв при ±37 °С та постійному перемішуванні при 600 об./хв. Агрегацію тромбоцитів індукували, додаючи до зразків АДФ у кінцевій концентрації 5×10^{-6} М, а процес агрегації контролювали протягом наступних 8 хв. Криві агрегації аналізували за допомогою комп'ютерного програмного забезпечення АТ-02 (Medtech, Росія). Криві, що відображали процес агрегації тромбоцитів у ПЗТ, інкубованої протягом 2 хв із рівним об'ємом 50 мМ Tpic-HCl буфера, pH 7,4, були використані як контроль для цього експерименту.

Одержані дані оброблено методом варіаційної статистики. Різниця вважалася достовірною при $p < 0,05$.

Результати та обговорення. Садовий равлик *Helix aspersa* є багатим джерелом біологічно активних природних речовин, які можуть стати важливою вихідною сировиною для отримання нових молекул із різними цільовими активностями, серед яких можуть бути і перспективні фармацевтичні агенти. В останні роки лікарі та косметологи використовують препарати слизу у складі кремів, лосьйонів та аерозолів. За рахунок високого вмісту біологічно активних речовин ці препарати сприяють швидкому загоєнню ран, регенерації шкіри, збереженню її еластичності й запобіганню утворення зморшок. Зважаючи на наш попередній досвід у сфері ідентифікації ефекторів системи гемостазу серед компонентів сировини природного походження, нам було цікаво проаналізувати слиз *H. aspersa* щодо присутності біологічно активних молекул із потенційними цільовими активностями, серед яких протеолітична дія, гемолітичний ефект, ефекторна дія на проензими плазми, вплив на коагуляційну та тромбоцитарну ланки гемостазу.

Якісний аналіз білкового складу слизу *H. aspersa* із застосуванням методу одновимірного диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію показав присутність у складі слизу широкого спектра білкових молекул, що різняться за молекулярними масами. Подальший аналіз електрофореграм за допомогою програми TotalLab 2.04 дозволив ідентифікувати 11 білкових зон, локалізація яких відповідала поліпептидам із молекулярною масою 17, 19, 21, 25, 28, 31, 45, 60, 82, 101 та 122 кДа (рис. 1).

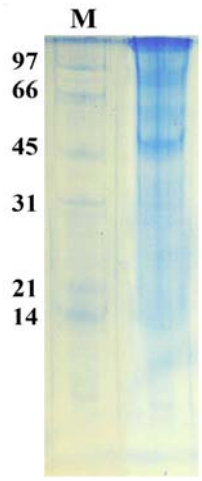

Рис. 1. Типова електрофореграма розділення білків слизу *H. aspersa*.
Трек М – маркери молекулярних мас (кДа)

Протеолітичну активність компонентів слизу *H. aspersa* досліджували методом ензим-електрофорезу. Поява світлих зон гідролізу у площині розділяючих гелів, що містили желатин, колаген і фабриноген як субстратні білки, слугувала доказом присутності у слизі *H. aspersa* активних ферментів, що виявляли специфічність до відповідних субстратів (типові ензим-електрофореграми не представлено). Отримані ензим-електрофореграми проаналізовано за допомогою програми TotalLab 2.04, що дозволило визначити молекулярні маси активних протеолітичних ферментів у слизі *H. aspersa* (табл. 1).

Таблиця* 1. Молекулярні маси протеолітичних ферментів, ідентифікованих у слизі *H. aspersa

Субстратний білок	Молекулярні маси ідентифікованих ензимів, кДа
Желатин	15, 33, 47, 59, 70, 83
Колаген	73, 93
Фібриноген	31, 50, 81, 96, 109

Специфічну протеолітичну активність компонентів слизу *H. aspersa* визначали за здатністю гідролізувати амідний зв'язок у синтетичних хромогенних субстратах, специфічних до плазміну (S_{2251}), тромбіну (S_{2238}), фактора Xa (S_{2222}) і протеїну С (S_{2366}). Ми також дослідили потенційний ефект компонентів слизу *H. aspersa* на відповідні проензими плазми. Для проведення цього експерименту в інкубаційне середовище, що містило зразок секрету *H. aspersa* додавали плазму крові кроля, а після 5-хвилинної інкубації вносили відповідний субстрат. Результати дослідження наведено на рис. 2. Установлено, що компоненти слизу, незважаючи на свій протеолітичний потенціал (табл. 1), не чинили значного ефекту на розщеплення відповідних синтетичних хромогенних субстратів (рис. 2, А), однак вони активували протромбін плазми й ініціювали утворення активного тромбіну, що виражалося в інтенсивному розщеплені субстрату – S2238 (рис. 2, Б).

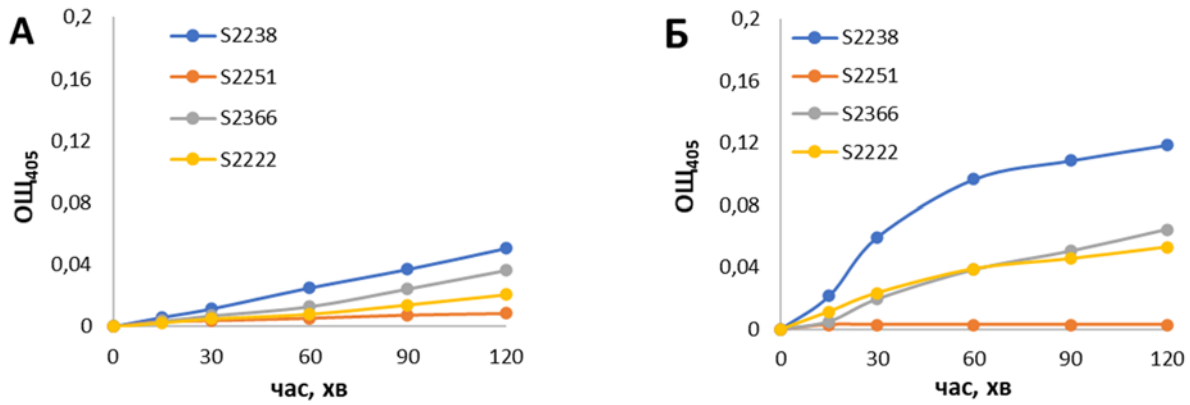

Рис. 2. Динаміка розщеплення специфічних пептидних субстратів компонентами слизу H. aspersa (А) та динаміка розщеплення специфічних пептидних субстратів ензимами плазми за умов її попередньої інкубації з компонентами слизу H. aspersa (Б); дані представлено як зміну оптичної щільності проб при 405 нм (ОЩ405)

Оскільки отримані результати вказують на можливі ефекторні дії біомолекул слизу *H. aspersa* щодо компонентів коагуляційного гемостазу, ми дослідили час згортання плазми крові у коагулометричних тестах – ПЧ, ТЧ і АЧТЧ, що разом дають можливість оцінити функціонування внутрішнього та зовнішнього шляхів коагуляційного гемостазу. Нам не вдалося виявити статистично значущих змін часу зсідання плазми крові у тестах ПЧ та ТЧ за умов інкубації плазми зі зразками слизу *H. aspersa* (табл. 2). Тоді як у ході інкубації плазми крові кроля зі зразком слизу *H. aspersa,* час згортання плазми у тесті АЧТЧ перевищив контрольні значення на 75 %. Оскільки серед компонентів слизу *H. aspersa* відмічено досить високий рівень протеолітичної активності, отримані результати можуть бути обумовлені деградацією факторів внутрішнього шляху коагуляційного гемостазу під впливом компонентів слизу. Однак це припущення має бути перевірене у подальших дослідженнях із використанням окремих білкових фракцій або, навіть, окремих компонентів слизу.

Таблиця* 2. Час зсідання плазми крові у коагуляційних тестах, за умови попередньої інкубації плазми зі зразком слизу *H. aspersa

Назва тесту	Контрольні показники (у секундах)	Показники за дії компонентів слизу *H. aspersa* (у секундах)
ПЧ	7,8 ± 0,2	7,2 ± 0,3
ТЧ	8,4 ± 0,3	8,3 ± 0,4
АЧТЧ	20,8 ± 1,3	36,7 ± 4,6*

* $p < 0,05$ – різниці достовірні, порівняно з контрольними показниками.

У нашому дослідженні ми оцінили потенційний ефект компонентів слизу *H. aspersa* на процес АДФ-залежної агрегації тромбоцитів. Як видно з отриманих результатів, компоненти слизу *H. aspersa* не чинили безпосереднього індукуючого ефекту на процес агрегації тромбоцитів, однак мали виражений потенціал посилювати ефект індуктора – $5x10^{-6}$ М АДФ (рис. 3). Показано, що показник ступеня максимальної АДФ-індукованої агрегації зростав пропорційно кількості білкового метеріалу зі слизу *H. aspersa* у збагаченій тромбоцитами плазмі (рис. 3). Відмічено виражений інгібуючий ефект на процес дезагрегації тромбоцитів. Такі результати, на нашу думку, представляють собою практичний інтерес і потребують детальнішого вивчення із залученням очищених білкових фракцій слизу.

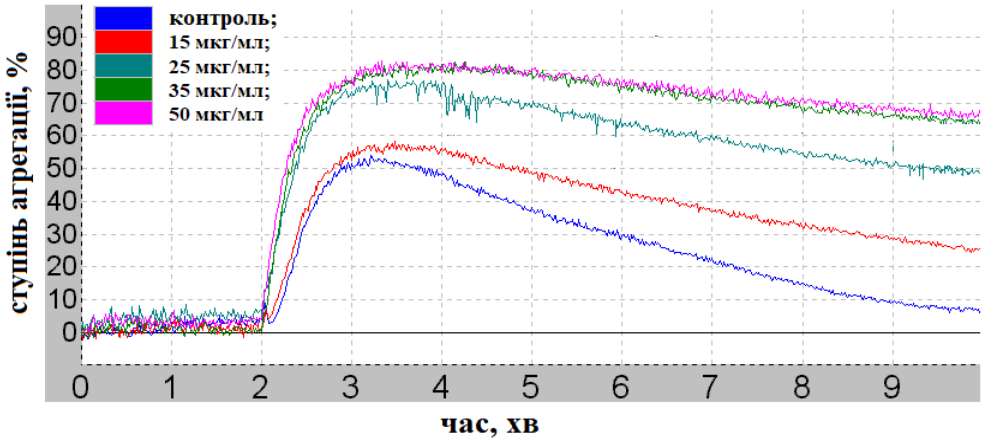

Рис. 3. Типові агрегатограми, що відображають АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів у ПЗТ за умови її попередньої 2-хвилинної інкубації зі зразком слизу *H. aspersa*

Аналіз гемолітичних ефектів компонентів слизу *H. aspersa* є швидким способом дослідити його цитотоксичний потенціал. Ступінь лізису еритроцитів (гемоліз) визначали спектрофотометричним методом, шляхом вимірювання вивільнення гемоглобіну в еритроцитарній суспензії після її півгодинної інкубації зі зразком слизу *H. aspersa* (100, 50, 20, 5 мкг загального білка на 1 мл суспензії клітин). Гемолітичний ефект порівнювали з ефектом 1% тритона Х-100 (табл. 3). Показано, що компоненти слизу *H. aspersa* не мали вираженого гемолітичного ефекту, що може слугувати доказом відсутності цитотоксичного потенціалу.

Таблиця* 3. Показники гемолітичної активності компонентів слизу *H. aspersa

Зразок		Оптична щільність зразків при 541 нм	Ступінь гемолізу в еритроцитарній суспензії
Негативний контроль		0,050 ± 0,001	-
Позитивний контроль		1,016 ± 0,004*	100 %
Слиз *H. aspersa*	100 мкг/мл	0,051 ± 0,001	ефект відсутній
	50 мкг/мл	0,052 ± 0,001	те саме
	20 мкг/мл	0,050 ± 0,001	"
	5 мкг/мл	0,053 ± 0,001	"

* $p < 0,05$ – різниці достовірні, порівняно з негативним контролем.

Висновки. Отже, унаслідок попереднього скринінгу потенційних ефектів компонентів слизу *H. aspersa* на окремі параметри системи гемостазу показано, що вказана природна сировина може бути перспективним джерелом біологічно активних речовин із вираженою протеолітичною активністю, здатністю впливати на коагуляційну та

тромбоцитарну ланки гемостаз. На нашу думку, перспективним є подальші дослідження, спрямовані на ідентифікацію окремих білкових молекул слизу *H. aspersa* та вивчення механізму їхньої дії. Розв'язання цих питань сприятиме цільовому використанню продуктів переробки неїстівних частин равликів і продуктів їхньої життєдіяльності, зокрема слизу, що є цікавим і перспективним з наукової й економічної точок зору, забезпечуючи "равликове господарство" додатковим доходом.

Список використаної літератури

1. Effects of feed protein and lipid contents on fatty acid profile of snail (Helix aspersa maxima) meat / M. C. Milinsk, R. das Graças Padre, C. Hayashi et al. // Journal of Food Composition and Analysis. – 2006. – Vol. 19 (2-3). – P. 212–216, doi:10.1016/j.jfca.2004.09.011
2. Hämäläinen E. M. Snails: biology, ecology, and conservation / E. M. Hämäläinen, S. Järvinen // Hauppauge. – NY: Nova Science Publisher's. – 2012. – 185 p.
3. Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail Helix aspersa / S. Pitt, M. A. Graham, C. Dedi et al. // British Journal of Biomedical Science. – 2015. – Vol. 72(4). – P. 174–181, doi.org/10.1080/09674845.2015.11665749.
4. Etim L. B. Antibacterial Properties of Snail Mucus on Bacteria Isolated from Patients with Wound Infection / L. B. Etim, C. Aleruchi, G. A. Obande // Brit. Microbiol. Res. J. – 2016. – Vol. 11 (2). – P. 1–9, doi: 10.9734/BMRJ/2016/21731.
5. Bioactive compounds isolated from garden snails / P. Dolashka, A. Dolashki, L. Velkova et al. // J Biosci Biotechnol. – 2015 – P. 147–155;
6. Mubarak M. Simultaneous determination of allantoin and glycolic acid in snail mucus and cosmetic creams with high performance liquid chromatography and ultraviolet detection / M. Mubarak, F. N. Lamari, Ch. Kontoyannis // J. Chromatogr A. – 2013. – Vol. 1322. – P. 49–53, doi: 10.1016/j.chroma.2013.10.086.
7. Glycine-rich peptides from *Cornu aspersum* snail with antibacterial activity / L. Velkova, A. Nissimova, A. Dolashki et al. // Bul Chem. Com. – 2018. – Vol. 50 (C). – P. 169–175.
8. Structure and antibacterial activity of isolated peptides from the mucus of garden snail *Cornu aspersum* / A. Dolashki, A. Nissimova, E. Daskalova et al. // Bul. Chem. Com. – 2018. – Vol. 50 (C). – P. 195–200.
9. Antioxidative screening of fractions from the mucus of garden snail Cornu aspersum // N. Kostadinova, Y. Voynikov et al. // P. Bul. Chem. Com., 2018. – Vol. 50 (C). – P. 176–183.
10. Ramos-Vasconcelos G. R. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail Helix aspersa / G. R. Ramos-Vasconcelos, M. Hermes-Lima // J Exp Biol. – 2003. – Vol. 206 (4). – P. 675–685, doi: 10.1242/jeb.00124.
11. Ramos-Vasconcelos G. R. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails Helix aspersa / G. R. Ramos-Vasconcelos, L. A. Cardoso, M. Hermes-Lima // Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. – 2005. – Vol. 140 (2). – P. 165–174, doi: 10.1016/j.cca.2005.01.015.
12. Molecular basis for the regenerative properties of a secretion of the mollusk Cryptomphalus aspersa / A. Brieva, N. Philips, R. Tejedor et al. // Skin Pharmacol Physiol. – 2008. – Vol. 21(1). – P. 15–22, doi: 10.1159/000109084.
13. Gabriel U. I. Quantification of mucoproteins (glycoproteins) from snails mucus,. Helix aspersa and Helix pomatia / U. I. Gabriel, S. Mirela, J. Ionel // Journal of Agroalimentary Processes and Technologies1. – 2011. – Vol. 17 (4). – P. 410–413.
14. Allantoin as a free-radical scavenger / E. P. Gus'kov, M. E. Kletskii, I. V. Kornienko et al. // Dokl. Biochem. Biophys. – 2002. – Vol. 383. – P.105–107, doi: 10.1023/a: 1015331601169.
15. Effect of Helix aspersa extract on TNFα, NF-κB and some tumor suppressor genes in breast cancer cell line Hs578T / I. El Ouar, C. Braicu, D. Naimi et al. // Pharmacogn. Mag. – 2017. – Vol. 13 (50). – P. 281–285, doi: 10.4103/0973-1296.204618.
16. In vitro antiproliferative effect of Helix aspersa hemocyanin on multiple malignant cell lines / O. Antonova, P. Dolashka, D. Toncheva et al. // Z. Naturforsch. C J Biosci. – 2014. – Vol. 69 (7-8). – P. 325–334, doi: 10.5560/znc.2013-0148.
17. In Vitro Influence of Extracts from Snail *Helix aspersa* Müller on the Colon Cancer Cell Line Caco-2 / M. Matusiewicz, I. Kosieradzka, T. Niemiec et al. // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 19(4). – P.1064, doi.org/10.3390/ijms19041064.
18. Bradford M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding / M. Bradford // Analytical Biochemistry. – 1976. – Vol. 7(72). – P. 248–254.
19. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227(5259). – P. 680–685.
20. Ostapchenko L. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system / L. Ostapchenko, O. Savchuk, N. Burlova-Vasilieva // Advances in Bioscience and Biotechnology. – 2011. – Vol. 2. – P. 20–26, doi:10.4236/abb.2011.21004.
21. Hemolytic activity of skin secretions of amphibians that inhabit the ukraine territory / Y. Kyriachenko, O. Oskyrko, I. Udovychenko, T. Halenova // Visnyk Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology. – 2020. – № 1(80). – P. 6–10, doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.6-10.
22. Evaluation of the biocompatibility of water-soluble pristine C_{60} fullerenes in rabbit / T. Halenova, N. Raksha, O. Savchuk et al. // BioNanoScience. – 2020, doi.org/10.1007/s12668-020-00762-w.

Reference (Scopus)

1. Milinsk M.C., das Graças Padre R., Hayashi C., de Oliveira C.C., Visentainer J.V., de Souza N.E., Matsushita M. Effects of feed protein and lipid contents on fatty acid profile of snail (Helix aspersa maxima) meat. Journal of Food Composition and Analysis. 2006; 19(2-3):212-216. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.09.011.
2. Hämäläinen E.M, Järvinen S. Snails: biology, ecology, and conservation. Hauppauge, NY: Nova Science Publisher's. 2012: 185.
3. Pitt SJ, Graham MA, Dedi CG, Taylor-Harris PM, Gunn A. Antimicrobial properties of mucus from the brown garden snail Helix aspersa. British Journal of Biomedical Science. 2015 ;72(4):174-81; quiz 208. DOI: 10.1080/09674845.2015.11665749.
4. Etim, L., Aleruchi, C., Obande, G. Antibacterial Properties of Snail Mucus on Bacteria Isolated from Patients with Wound Infection. Microbiology Research Journal International. 2015; 11(2), 1-9. https://doi.org/10.9734/BMRJ/2016/21731
5. Dolashka P, Dolashki A, Velkova L, Stevanovic S, Molin L, Traldi P, et al. Bioactive compounds isolated from garden snails. J Biosci Biotechnol. 2015; SE:147–55.
6. El Mubarak MA, Lamari FN, Kontoyannis C. Simultaneous determination of allantoin and glycolic acid in snail mucus and cosmetic creams with high performance liquid chromatography and ultraviolet detection. J Chromatogr A. 2013; 1322:49-53. doi: 10.1016/j.chroma.2013.10.086.
7. Velkova L., Nissimova A., Dolashki A., et al. Glycine-rich peptides from Cornu aspersum snail with antibacterial activity. Bul Chem. Com. 2018; 50 (C), 169-175.
8. Dolashki A., Nissimova A., Daskalova E., Velkova L., Topalova Y., Hristova P., et al. Structure and antibacterial activity of isolated peptides from the mucus of garden snail Cornu aspersum. Bulgarian Chemical Communications C. 2018; 50. doi:10.13140/RG.2.2.23394.38086
9. Kostadinova N., Voynikov Y., Dolashki A., Krumova E., Abrashev R., Kowalewski D., et al. Antioxidative screening of fractions from the mucus of garden snail Cornu aspersum. Bul. Chem. Com. 2018; 50(C), 176–183.
10. Ramos-Vasconcelos GR, Hermes-Lima M. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail Helix aspersa. J Exp Biol. 2003; 206(Pt 4):675-85. doi: 10.1242/jeb.00124.
11. Ramos-Vasconcelos GR, Cardoso LA, Hermes-Lima M. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails Helix aspersa. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2005;140(2):165-74. doi: 10.1016/j.cca.2005.01.015.
12. Brieva A, Philips N, Tejedor R, Guerrero A, Pivel JP, Alonso-Lebrero JL, Gonzalez S. Molecular basis for the regenerative properties of a secretion of the mollusk Cryptomphalus aspersa. Skin Pharmacol Physiol. 2008;21(1):15-22. doi: 10.1159/000109084.
13. Gabriel UI, Mirela S, Ionel J. Quantification of mucoproteins (glycoproteins) from snails mucus, Helix aspersa and Helix Pomatia. J Agroaliment Process Technol. 2011; 17:410–13.
14. Gus'kov EP, Kletskii ME, Kornienko IV, Olekhnovich LP, Chistyakov VA, Shkurat TP, Prokof'ev VN, Zhdanov Y. Allantoin as a free-radical scavenger. Dokl Biochem Biophys. 2002; 383:105-7. doi: 10.1023/a:1015331601169.
15. El Ouar I, Braicu C, Naimi D, Irimie A, Berindan-Neagoe I. Effect of Helix aspersa extract on TNFα, NF-κB and some tumor suppressor genes in breast cancer cell line Hs578T. Pharmacogn Mag. 2017;13(50):281-285. doi:10.4103/0973-1296.204618.
16. Antonova O, Dolashka P, Toncheva D, Rammensee HG, Floetenmeyer M, Stevanovic S. In vitro antiproliferative effect of Helix aspersa hemocyanin on multiple malignant cell lines. Z Naturforsch C J Biosci. 2014;69(7-8):325-334. doi:10.5560/znc.2013-0148
17. Matusiewicz M, Kosieradzka I, Niemiec T, et al. In Vitro Influence of Extracts from Snail Helix aspersa Müller on the Colon Cancer Cell Line Caco-2. Int J Mol Sci. 2018;19(4):1064. doi:10.3390/ijms19041064
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72:248-254. doi:10.1006/abio.1976.9999
19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0
20. Ostapchenko, L., Savchuk, O., Burlova-Vasilieva, N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system. Advances in Bioscience and Biotechnology. 2011; 2:20-26. doi: 10.4236/abb.2011.21004.
21. Kyriachenko Y., Oskyrko O., Udovychenko I., et al. Hemolytic activity of skin secretions of amphibians that inhabit the ukraine territory. Visnyk Taras Shevchenko National University of Kyiv. Biology. 2020; 1(80): 6-10. doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.6-10.
22. Halenova T., Raksha N., Savchuk O., et al. Evaluation of the biocompatibility of water-soluble pristine C_{60} fullerenes in rabbit. BioNanoScience. 2020. doi.org/10.1007/s12668-020-00762-w.

Надійшла до редколегії 4.01.2021
Отримано виправлений варіант 1.02.2021
Підписано до друку 1.02.2021

Received in the editorial 4.01.2021
Received a revised version on 1.02.2021
Signed in the press on 1.02.2021

Е. Кирьяченко, студ., Т. Галенова, канд. биол. наук, О. Савчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина

АНАЛИЗ СЛИЗИ САДОВОЙ УЛИТКИ (*Helix aspersa Muller*) НА ПРИСУТСТВИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОРОВ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗА

На сегодняшний день существует много подходов к созданию новых лекарственных препаратов, однако ни один из них не может заменить важную роль природных продуктов в открытии и разработке лекарств. Природное сырье остается чрезвычайно важным источником лекарственных средств. Ряд биологически активных молекул природного происхождения уже нашли непосредственное лекарственное применение, многие другие могут служить химическими моделями или шаблонами для проектирования и синтеза новых фармацевтических агентов. Слизь улиток уже много лет привлекает внимание ученых как источник природных биологически активных веществ. Компоненты слизи улиток были неоднократно исследованы на антимикробную, антиоксидантную, противовоспалительную и противораковую активности. В данной работе были исследованы биологические эффекты компонентов слизи садовой улитки Helix aspersa, распространенной на территории Украины. Результаты исследований показали присутствие белковых молекул, среди которых часть имела выраженный протеолитический потенциал со специфичностью к желатину, коллагену и фибриногену. При добавлении слизи к плазме крови ее составляющие инициировали образования активного тромбина, а также продлевали время свертывания плазмы в коагуляционном тесте АЧТВ. Кроме того, компоненты слизи H. aspersa усиливали эффект индуктора агрегации тромбоцитов и ингибировали их дезагрегацию. Доказано, что компоненты слизи H. aspersa не имели цитотоксического эффекта. Полученные результаты указывают на перспективность и важность дальнейших экспериментов по изучению отдельных белковых фракций слизи с целью идентификации отдельных биологически активных молекул, отвечающих за проявление показанных эффектов. Детальный анализ состава и изучение свойств слизи улиток служит основой для получения потенциально новых веществ с целевыми активностями и их дальнейшего применения в различных сферах промышленности, включая фармацевтическую.

Ключевые слова: улитка, слизь, протеолитическая активность, система гемостаза, хронометрические тесты, гемолитическая активность.

Y. Kyriachenko, Student, T. Halenova, PhD, O. Savchuk, Dr Hab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ANALYSIS OF GARDEN SNAIL (*Helix aspersa Muller*) MUCUS FOR THE PRESENCE OF POTENTIAL EFFECTORS OF HEMOSTASIS SYSTEM

Today, there are many approaches to new drugs development, but none of them can replace the important role of natural products in the discovery and development of drugs. Natural raw materials remain an extremely important source of medicines. A number of biologically active molecules of natural origin have already found a direct medicinal use, while many others can serve as chemical models or templates for the design and synthesis of new pharmaceutical agents. Snail mucus has been attracting the attention of scientists for many years as a source of natural biologically active substances. The components of snail mucus have been repeatedly tested for antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities. In this work, the biological effects of components of the mucus of the garden snail Helix aspersa, distributed in Ukraine, were studied. The research results proved the presence of protein molecules, some of which had a pronounced proteolytic potential with specificity for gelatin, collagen and fibrinogen. When mucus was added to blood plasma, its components initiated the formation of active thrombin, and also prolonged the clotting time of plasma in the coagulation test APTT. In addition, the components of H. aspersa mucus enhanced the effect of platelet aggregation inducer and inhibited their disaggregation. It was proved that the components of H. aspersa mucus had no cytotoxic effect. The obtained results indicate the prospects and importance of further experiments on the study of mucus protein fractions in order to identify individual biologically active molecules responsible for the manifestation of these effects. A detailed analysis of the composition and study of the properties of snail mucus will serve as a basis for obtaining potentially new substances with targeted activities and their further use in various industries, including pharmaceutical.

Keywords: snail, mucus, proteolytic activity, hemostasis system, plasma coagulation tests, hemolytic activity.

УДК 577.112.8
DOI 10.17721/1728_2748.2021.84.24–27

A. Beliayeva, trainee, L. Garmanchuk, Dr Hab.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

ANALYSIS OF FUNCTIONAL CHANGES UNDER USING OF CANDESARTAN CILEXETIL WITH RESVERATROL IN ANIMALS

Cardiovascular diseases are widespread throughout the world. The incidence of diseases of the cardiovascular system has increased several times. Cardiovascular diseases have become the leading cause of death in many countries. Currently, the efforts of many researchers are aimed at studying and creating new, more effective and safe drugs and their combinations for the treatment of pathology of the cardiovascular system. Candesartan cilexetil is an angiotensin II receptor antagonist. It is used medicinally as a long-acting antihypertensive agent. However, this drug has a number of side effects. Resveratrol is a natural antioxidant. This substance exhibits pleiotropic effects, including antioxidant, anti-inflammatory, anti-aging, cardioprotective, and neuroprotective activities. The aim is investigation of acute toxicity of candesartan cilexetil and resveratrol in combination in vivo. Male and female ICR mice were used for the experiment. Animals received candesartan cilexetil and resveratrol intragastrically once. Evaluation of the effects of substances on internal organs (heart, spleen, kidneys, lungs, liver and brain) was carried out in 2 weeks after the introduction of the substances. It was shown that candesartan cilexetil with natural resveratrol did not lead to functional changes. There were no changes of behavior during the observation period. The combination of candesartan cilexetil with resveratrol did not lead to the death of mice, therefore the mean lethal dose (LD50) was not determined. The new combination of substances was safe. No side effects have been reported. The combination of candesartan cilexetil with resveratrol is non-toxic, and the use of these substances is safe for animals.

Keywords: Cardiovascular diseases, candesartan cilexetil, resveratrol, acute toxicity.

Introduction. Cardiovascular diseases are widespread in the world. The incidence of diseases of cardiovascular system has increased several times in many countries. Cardiovascular diseases have become the leading mortality reason in many countries. At present many scientists and doctors try to study and create new more effective and safe drugs and their combinations to treat this pathology. It's necessary to investigate new methods of treatment of cardiovascular diseases.

Candesartan cilexetil is an angiotensin II receptor antagonist. Now it is used as a long-term antihypertensive agent [1]. Candesartan cilexetil increases resistance to stress and endurance during exercise in people with hypertension [2]. However, it is shown that candesartan has also a number of side effects, such as dizziness, weakness, headache. High doses of candesartan cilexetil influence the formation of separate subpopulations of cells in bone

© Beliayeva A., Garmanchuk L., 2021