

# ТЕСТИРОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ *PLEUROTUS OSTREATUS*, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИПОСОМНОЙ МОДЕЛИ

Калько Е.И.

Калько Елена Ивановна – аспирант,  
кафедра биотехнологии,

Полесский государственный университет, г. Пинск, Республика Беларусь

**Аннотация:** исследована антиоксидантная активность культуральной жидкости *Pleurotus ostreatus* с использованием липосомной модели. Антиоксидантные свойства оценивали по степени замедления перекисного окисления липосом в присутствии культуральной жидкости *P. ostreatus* с разной концентрацией ионов марганца. Установлено, что при культивировании *P. ostreatus* с обогащением питательной среды марганцем в концентрациях 0,025 мг/л, 0,5 мг/л питательной среды, культуральная жидкость проявляет антиоксидантную активность, по сравнению с концентрациями 0 мг/л, 0,1 мг/л, 2,5 мг/л, 10,0 мг/л.

**Ключевые слова:** окислительный стресс, антиоксиданты, базидиомицеты, липосомная модель.

УДК 60

Поддержание окислительно-восстановительного гомеостаза в живых организмах, обеспечивается комплексом взаимосвязанных биохимических процессов. Живой организм открытая термодинамическая система, реагирующая на негативные изменения биосферы. Патогенетическим фактором изменений прооксидантно-антиоксидантного статуса являются свободные радикалы. Их образования стимулируют различные стрессы, неблагоприятные экологические условия и электромагнитные излучения [1, стр. 148]. Взаимодействие свободных радикалов и антиоксидантов является неотъемлемой частью жизнедеятельности живых организмов. Наличие в клетках эффективных антиоксидантных систем, которые способствуют обеспечению защиты от активных форм кислорода, обеспечивают достаточную устойчивость к окислительным стрессам. Использование антиоксидантов могут способствовать разрыву патологической цепи, уменьшить предпосылки к развитию патологических процессов, способствовать расширению адаптационных способностей организма и профилактике нарушений [2, стр. 106].

Актуальным становится поиск средств лечения и профилактики патогенетических нарушений соотношения процессов образования и обезвреживания активных форм кислорода. Сегодня для улучшения условий профилактики и лечения заболеваний широко используются современные методы биотехнологии. Применение антиоксидантов позволит увеличить биологический возраст и способность организма противостоять вредным воздействиям окружающей среды, а также различным патологическим процессам.

Антиоксиданты природного происхождения эффективны и более безопасны, чем химические соединения, и могут влиять не на следствия болезни, а на ее причины [3, стр. 5574]. Возрастание интереса к лекарственным средствам на основе биологически активных соединений природного происхождения обусловлено, возрастаньем аллергизации населения, вследствие использования синтетических лекарственных препаратов.

Базидиальные грибы продуцируют различные биологически активные вещества со специфическим химическим составом, не имеющим аналогов в растительном и животном мире [4, с 9-16]. Благодаря присутствию широкой гаммы биологически активных соединений, базидиомицеты могут быть использованы в качестве сырья для целенаправленного создания препаратов фармацевтического, косметического, пищевого и другого целевого назначения.

**Материал и методы исследования.** Нами использован метод оценки антиоксидантной активности культуральной жидкости *P. ostreatus* с использованием липосомной модели [5, стр. 122]. В исследовании использовали дикий штамм *P. ostreatus*, выделенный в 2014 г. из плодовых тел, растущих на тополе в г. Минске [6, стр. 97].

Липосомная модель представляет собой самопроизвольно образующиеся в смесях фосфолипидов с физиологическим раствором или водой замкнутые пузырьки – липосомы. Стенка, которых состоит из одного или нескольких слоев фосфолипидов. Внутри липосом содержится вода или раствор. С помощью липосом изучают воздействие на клеточные мембраны [7, стр. 69]. К супероксидному радикалу могут присоединиться 1 электрон и 2 протона водорода, что в результате приводит к образованию перекиси водорода, которая может растворяться в липидном бислое и диффундировать через мембрану. Дальнейшее одноэлектронное восстановление перекиси водорода приводит к образованию гидроксильного радикала  $\text{OH}^\bullet$  – сильного окислителя. Гидроксильный радикал не способен к внутриклеточной миграции, так как моментально вступает в реакцию с биомолекулами. Таким образом, перекись способствует образованию токсичных активных форм кислорода [8, стр. 111].

Целью данного эксперимента будет являться оценка устойчивости липосомной модели к перекисному окислению в присутствии культуральной жидкости *P. ostreatus*.

Липосомную модель изготовили из лецитина соевого (массовая доля фосфолипидов 97%) в 0,9% растворе NaCl. Суспензию липосом центрифугировали 10 мин. при обороте 2000 об./мин; использовали насадочную жидкость для исследований. В качестве стрессового фактора в суспензию липосом вводили 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Исследуемый объект объемом 1,0 мл помещали в стеклянную кювету спектрофотометра SP8001, и проводили измерения динамики оптической плотности во времени при длине волны 460 нм, по следующей схеме: в каждом варианте измеряли оптическую плотность поминутно в течение 5 мин. в трехкратной повторности. Антиоксидантная активность оценивали по степени замедления перекисного окисления липосом в присутствии культуральной жидкости *P. ostreatus*. Результаты обрабатывали в программе «*Statistica 6.0*».

Для эксперимента 1 использовали культуральную жидкость *P. ostreatus*, полученную при глубинном культивировании без добавления в питательную среду марганца (n = 3) [10, стр. 312, 9, стр. 520].

Схема эксперимента 1:

Контроль 1 – 1,0 ml 0,5% суспензии липосом.

Контроль 2 – 1,0 ml 0,5% суспензии липосом + 0,1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Вариант 1 – 1,0 ml 0,5% суспензии липосом + 0,1 ml культуральной жидкости *P. ostreatus* без добавления марганца + 0,1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Значение марганца для жизни и нормальной жизнедеятельности организмов многообразно. Он входит в состав всех органов и тканей, участвует в жизнедеятельности живых организмов. Данный микроэлемент усиливает интенсивность дыхания, окислительно-восстановительные процессы, активизирует ферменты.

Для эксперимента 2 использовали культуральную жидкость *P. ostreatus*, полученную при глубинном культивировании с обогащением питательной среды марганцем различной концентрации (n = 3).

Схема эксперимента 2.

Контроль 1 – 1,0 ml 0,5% суспензии липосом.

Контроль 2 – 1,0 ml 0,5% суспензии липосом + 0,1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Вариант 1 – 1,0 ml 0,5% суспензии липосом + 0,1 ml культуральной жидкости *P. ostreatus* без добавления марганца + 0,1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Вариант 2 – 1,0 ml 0,5% суспензии липосом + 0,1 ml культуральной жидкости *P. ostreatus* (культивировали с добавлением марганца 0,025 мг/л) + 0,1 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Вариант 3 – 1,0 ml 0,5% суспензии липосом + 0,1 ml культуральной жидкости *P. ostreatus* (культивировали с добавлением марганца 0,1 мг/л) + 0,1 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Вариант 4 – 1,0 ml 0,5% суспензии липосом + 0,1 ml культуральной жидкости *P. ostreatus* (культивировали с добавлением марганца 0,5 мг/л) + 0,1 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Вариант 5 – 1,0 ml 0,5% суспензии липосом + 0,1 ml культуральной жидкости *P. ostreatus* (культивировали с добавлением марганца 2,5 мг/л) + 0,1 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Вариант 6 – 1,0 ml 0,5% суспензии липосом + 0,1 ml культуральной жидкости *P. ostreatus* (культивировали с добавлением марганца 10,0 мг/л) + 0,1 ml 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Результаты и их обсуждение.** Как показали результаты эксперимента, оптическая плотность суспензии липосом без дополнительных воздействий (контроль 1) в течение эксперимента не изменяется, что свидетельствует о стабильности полученной липосомной модели. При добавлении в суспензию липосом перекиси водорода (контроль 2) наблюдается снижение оптической плотности на 18,9% в первую минуту эксперимента и снижение оптической плотности ещё на 1% в течение пяти минут измерений. Общее уменьшение оптической плотности суспензии липосом в присутствии перекиси водорода составило 19,9%. Действие окислительного стресса в присутствии перекиси водорода приводит к уменьшению оптической плотности суспензии липосом.

В присутствии культуральной жидкости, при культивировании *P. ostreatus* без добавления марганца, соответственно к контролю 1 наблюдается снижение оптической плотности на 27% в первую минуту эксперимента и снижение оптической плотности ещё на 0,5% в течение пяти минут измерений. Общее уменьшение оптической плотности суспензии липосом в присутствии перекиси водорода составило 27,5% (рисунок 1).

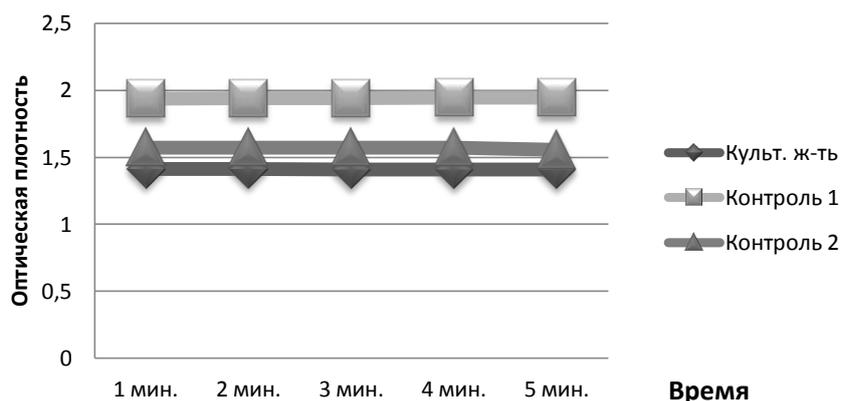


Рис. 1. Влияние культуральной жидкости *P. ostreatus* на устойчивость суспензии липосом

В присутствии культуральной жидкости, при культивировании *P. ostreatus* с обогащением марганцем 0,025 мг/л, соответственно к контролю 1 наблюдается снижение оптической плотности на 37,23% в первую минуту эксперимента и повышение оптической плотности ещё на 5,86% в течение пяти минут измерений. Общее уменьшение оптической плотности суспензии липосом в присутствии перекиси водорода составило 31,37%. При культивировании *P. ostreatus* с обогащением марганцем 0,5 мг/л, соответственно к контролю 1 наблюдается снижение оптической плотности на 37,33% в первую минуту эксперимента и повышение оптической плотности ещё на 0,2% в течение пяти минут измерений. Общее уменьшение оптической плотности суспензии липосом в присутствии перекиси водорода составило 37,13%. Культивирование *P. ostreatus* с обогащением марганцем 0,1 мг/л, соответственно к контролю 1 наблюдается снижение оптической плотности на 46,57% в первую минуту эксперимента и снижение оптической плотности ещё на 1,78% в течение пяти минут измерений. Общее уменьшение оптической плотности суспензии липосом в присутствии перекиси водорода составило 48,37%. С обогащением марганцем 2,5 мг/л, соответственно к контролю 1 наблюдается снижение оптической плотности на 48,58% в первую минуту эксперимента и снижение оптической плотности ещё на 1,05% в течение пяти минут измерений. Общее уменьшение оптической плотности суспензии липосом в присутствии перекиси водорода составило 49,63%. С обогащением марганцем 10,0 мг/л, соответственно к контролю 1 наблюдается снижение оптической плотности на 50,33% в первую минуту эксперимента и снижение оптической плотности ещё на 0,39% в течение пяти минут измерений. Общее уменьшение оптической плотности суспензии липосом в присутствии перекиси водорода составило 50,71% (рисунок 2).

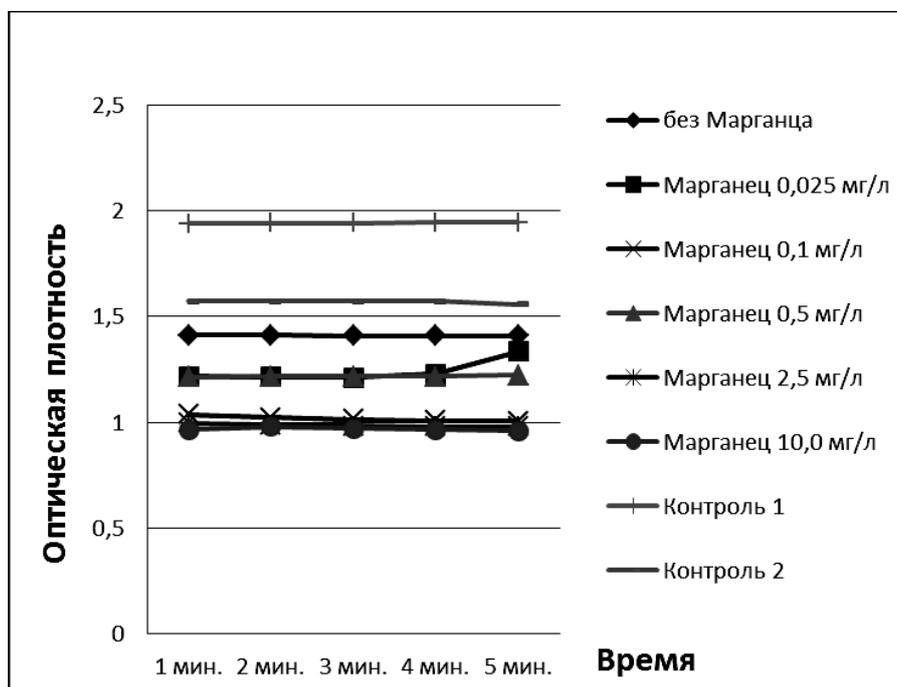


Рис. 2. Влияние культуральной жидкости *P. ostreatus* с разной концентрацией ионов марганца на устойчивость суспензии липосом

В разных вариантах эксперимента развитие окислительного стресса липосом протекает с разной скоростью, что позволяет оценить антиоксидантную активность исследуемых объектов. Для каждого временного отрезка высчитаем средний показатель оптической плотности из трехкратной повторности. Антиоксидантную активность оцениваем по замедлению перекисного разрушения липосом в присутствии культуральной жидкости *P. ostreatus* в условиях без добавления марганца и при обогащении питательной среды марганцем различных концентраций.

Таким образом, при культивировании *P. ostreatus* с добавлением марганца в питательную среду, в концентрации 0,025 мг/л культуральная жидкость проявляет антиоксидантную активность, так как оптическая плотность нарастает на 5,86 %. При культивировании *P. ostreatus* с добавлением марганца в концентрации 0,5 мг/л антиоксидантная активность нарастает на 0,2%.

При культивировании *P. ostreatus* с добавлением марганца в концентрациях 0 мг/л, 0,1 мг/л, 2,5 мг/л, 10,0 мг/л происходит снижение оптической плотности.

**Вывод.** Липосомная модель может использоваться для выявления наиболее оптимальных концентраций марганца для добавления в питательную среду при глубинном культивировании базидиальных грибов, что позволит увеличить эффективность препаратов и рационально использовать сырье для получения биологически активных веществ.

### Список литературы

1. Барабой В.А. Перекисное окисление и стресс / В.А. Барабой [и др.]; под общ. ред. В.А. Барабой. СПб.: Наука, 1992. 148 с.
2. Костюк В.А. Биорадикалы и биоантиоксиданты: Монография / В.А. Костюк, А.И. Потапович. Минск: БГУ, 2004. 174 с.
3. Procyanidin, anthocyanin and chlorogenic acid contents of high bush and low bush blueberries / A. Rodriguez-Mateos [et al.] // Journal of agricultural and food chemistry, 2012. Vol. 60. № 23. P. 5772–5778.
4. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов: Монография / З.Э. Беккер. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 230 с.
5. Кайгородов Р.В. Тестирование антиоксидантных свойств, спиртовых экстрактов прополиса с использованием липосомной модели / Р.В. Кайгородов // Междунар. науч. инст. «Educatio» IV (11). Биол. Науки, 2015. С. 121–124.
6. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре / А.С. Бухало. К.: Наук. думка, 1988. 144 с.
7. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в живых системах / Ю.А. Владимиров и [др.] // Итоги науки и техники. Биофизика. Т. 29. С. 67 – 72.
8. Чупахина Г.Н. Природные антиоксиданты (экологический аспект) / Г.Н. Чупахина, П.В. Масленников, Л.Н. Скрыпник. Калининград: Балтийский федеральный университет им. И. Канта, 2011. 111 с.
9. Бисько Н.А. Высшие съедобные базидиомицеты в поверхностной и глубинной культуре / Н.А. Бисько, А.С. Бухало, С.П. Вассер [и др.]; под ред. И.А. Дудки. К.: Наук. думка, 1983. 312 с.
10. Чугай А.С. Апробация питательных сред на основе корнеплодов для глубинного культивирования вешенки обыкновенной / А.С. Чугай, [и др.] // Вестник Полесского государственного университета. С. 520–522.