

УДК 581.192:582.287.37

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ДИНАМІКИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ШТАМІВ ЇСТІВНИХ ЛІКАРСЬКИХ ГРИБІВ *LENTINULA EDODES* (BERK.) PEGLER. ТА *FLAMMULINA VELUTIPES* (CURT. EX FR.) SING.**

О.В. Федотов, О.В. Чайка

**Вступ.** В теперішній час не викликає сумнівів, що процеси вільнорадикального окиснення (ВРО) відіграють важливу роль в життєдіяльності клітин. Це пов'язано з двома основними моментами: з одного боку, реакції ВРО є необхідним етапом різних метаболічних процесів, а з іншого, підвищена інтенсивність ВРО в багатьох випадках є або наслідком, або причиною тих чи інших патологічних змін в клітинах та тканинах [1, 2].

Реакції перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), будучи складовою частиною кисневого режиму організму, ініціюються активованими формами кисню, що утворюються в системах його транспорту й утилізації, а основним субстратом є поліненасичені жирні кислоти [3, 4]. Маючи ланцюговий, вільнорадикальний характер, цей клас реакцій супроводжується утворенням різноманітних сполук, що мають високу біологічну ефективність, що проявляється в розвитку ряду характерних змін на рівні клітинних систем організму [5].

В нормі швидкість реакцій ПОЛ підтримується на стаціонарному рівні. Регуляція інтенсивності ПОЛ відбувається як на рівні утворення радикалів, так і їх утилізації за допомогою антиоксидантних ферментів, до яких належить каталаза, супероксиддисмутаза, пероксидаза та ін. [6]. Активація процесів ПОЛ свідчить про наявність ушкоджень, які притаманні раннім періодам адаптації, фазі виснаження адаптації, загостренню хронічних захворювань. Нормальна активність чи незначне пригнічення вказує на задовільне пристосування організму до існуючих умов, посилення біосинтетичних процесів, розвиток ремісії захворювання. Надмірне пригнічення характерно для тяжкого, наближеного до повного виснаження, стану організму [2].

Внаслідок неконтрольованих процесів ПОЛ відбувається порушення структури біомембран, розбалансування окислювально-відновних процесів, інгібування мембранзв'язаних ферментів [7, 8].

Накопичується все більше даних про те, що реакції перекисного окиснення ліпідів, маючи універсальний характер, є показником стійкості стаціонарного режиму перетворень в організмі [3, 9], що впливає на його адаптаційні потенції та визначає можливість розвитку патології. Ця властивість обумовлена високою біологічною активністю сполук, які утворюються в реакціях перекисного окиснення ліпідів, а також комплексом системних перебудов метаболізму, змінами характеру міжклітинних та міжсистемних взаємовідносин, що потенціюються ними [4].

За останні роки, гриби стали об'єктом широких досліджень. Це пов'язано, в першу чергу, з їх здатністю синтезувати біологічно активні речовини – антибіотики, вітаміни, ферменти, стерини та інші БАР, багато з них є цінним продуктом харчування [10-14].

Крім того, частина грибів виділена в групу лікарських, з широкими перспективами використання в медицині, бо мають широкий лікувальний діапазон, зокрема стримують ріст злоякісних пухлин, спроможні до синтезу ферментів і інші лікарські властивості [11, 15, 16].

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler. – сїтаке – один з найбільш популярних їстівних ксилотрофів у східних країнах. Гриб виявляє загальнозміцнюючу, антивірусну, антиоксидантну, гіпотензивну, протипухлинну, гіпоглікемічну, гіполіпідемічну, антистресову лікарську дію, підвищує імунітет. Глибинним методом вирощування сїтаке отримують низку цінних лікарських препаратів [15, 17].

*Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. – опеньок зимовий – їстівний європейський гриб, росте взимку, навіть під снігом [18]. В плодкових тілах виявлено речовини, що мають антиоксидантні властивості, а також протипухлинну, імуномодельуючу, радіопротекторну дію [15, 16].

Метою нашої роботи було визначення і порівняння динаміки росту та інтенсивності перекисного окиснення ліпідів штамів *Lentinula edodes* і *Flammulina velutipes* для індикації умов культивування та з'ясування видових біосинтетичних відмінностей цих лікарських грибів.

**Матеріали і методи дослідження.** Об'єкти дослідження – штами 340, 511 і 523 *Lentinula edodes* і штам F-06 *Flammulina velutipes*.

З метою визначення динаміки перекисного окиснення ліпідів, ростових та біохімічних показників, штами культивували за оптимальних для росту температурах, що були встановлені в попередніх дослідках [19, 20]. Культивування штамів проводили в колбах Ерленмейера об'ємом 250 мл на стерильному глюкозо-пептонному живильному середовищі об'ємом 50 мл (рН<sub>0</sub> = 6,25) наступного складу, г/л: глюкоза – 10,0; пептон – 3,0; КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – 0,6; К<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub> – 0,4; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,5; CaCl<sub>2</sub> – 0,05; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O – 0,001; дистильована вода – до 1л.

Термін культивування – 20 діб, показники росту та інтенсивності ПОЛ в КФ і міцеліальному гомогенаті (МГ), фіксували через кожні 5 діб ферментації. Накопичення біомаси визначали ваговим методом, рН культурального фільтрату (КФ) – на рН-метрі [21, 22].

Інтенсивність ПОЛ визначали за допомогою тесту з тіобарбітуровою кислотою (ТБК). Метод заснований на визначенні кількості забарвленого продукту, який має максимум поглинання в червоному видимому спектрі при довжині хвилі 532 нм. Забарвлений продукт утворюється в результаті взаємодії двох молекул ТБК з одною молекулою малонового діальдегіду (МДА) – одного із вторинних продуктів ПОЛ [5, 22]. Встановлено, що реакцію з ТБК дає не тільки МДА, а й багато інших карбонільних сполук, які утворюються під час ПОЛ. Тому разом їх називають ТБК-активні продукти (ТБК-АП). Кількість МДА у тканинах виражали у наномолях МДА (А) на 1 г маси досліджуваного матеріалу. Розрахунки вели за формулою [19, 22]:

$$A = \frac{D_{532} \cdot 10 \cdot V \cdot \alpha}{P \cdot \varepsilon},$$

де  $D_{532}$  – показники оптичної густини при 532 нм;  $V$  – об'єм реакційної суміші (4 мл);  $\alpha$  – відношення загального об'єму витяжки до об'єму проби, яку взято для визначення МДА;  $\varepsilon$  – молярний коефіцієнт екстинції, складає  $155000 \text{ л см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$ ;  $P$  – наважка матеріалу, г.

Отримані експериментальні дані обробляли з використанням програм для проведення статистичної обробки результатів біологічних експериментів [23].

**Результати та їх обговорення.** Дані динаміки росту штамів *Lentinula edodes* і *Flammulina velutipes*, зміни рН культурального фільтрату та вмісту малонового діальдегіду у процесі розвитку культур представлені в графічному вигляді на рис. 1, 2, 3 і 4.

Під час культивування штамів 340, 511 і 523 *Lentinula edodes* спостерігалось різке підвищення вмісту продуктів ПОЛ в міцелії досліджуваних штамів до максимального рівня на 5-ту добу росту, після цього – поступове зниження їх концентрації до мінімального рівня на 15-ту добу ферментації, а наприкінці культивування – на 20-ту добу – відбувається незначне підвищення вмісту ТБК-АП. Вміст активних продуктів до тіобарбітурової кислоти в культуральному фільтраті досліджених штамів є меншим у порівнянні з таким для міцелію і набуває максимуму для штамів 340 і 523 на 15-ту добу росту, а для штаму 511 – на 10-ту добу.

Під час культивування штамів сїтаке відбувається зниження рН культурального фільтрату до мінімального значення на 20-ту добу росту штамів 340 і 523. Для штаму 511 характерне зниження рН середовища до 3,99 од. на 15-ту добу росту та підвищення до 5,54 рН – на 20-ту добу. Мінімальний рівень кислотності живильного середовища збігається за часом з максимальним накопиченням біомаси штамами. За накопиченням біомаси штами розташовуються в такому порядку убавання 340, 523 та 511.

Під час культивування штаму F-06 *Flammulina velutipes* спостерігається поступове зниження водневого показника культурального фільтрату до рівня 5,43 на 20-ту добу росту.

Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів в міцелії має зворотньопропорційну залежність від їх росту, тобто максимальний вміст малонового діальдегіду зафіксовано при мінімальному накопиченні біомаси – на 5-ту добу ферментації. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів в міцелії знаходиться на мінімальному рівні на 15-ту добу. Вміст активних продуктів до тіобарбітурової кислоти в культуральному фільтраті дослідженого штаму є незначним і знаходиться приблизно на одному рівні впродовж всього строку ферментації.

Порівняння отриманих експериментальних даних доводить про те, що кожен з досліджених штамів *Lentinula edodes* та *Flammulina velutipes* має індивідуальні характеристики росту та інтенсивності ліпідної пероксидації, та дозволяють окреслити такі загальні закономірності динаміки їх культивування.

Поступове зниження водневого показника культурального фільтрату, що є зворотньопропорційним процесом до збільшення біомаси штамів (виключенням є штам 511, в якого найменший рН КФ зафіксовано на 15-ту добу росту).

За накопиченням біомаси на глюкозо-пептонному живильному середовищі штами розташовуються в такому порядку убавання F-06, 340, 523 та 511.

Вміст ТБК-АП в міцелії штамів спочатку зростає до максимального рівня на 5-ту добу росту, що ймовірно пов'язано з адаптацією культур до нових умов живлення, потім знижується впродовж культивування до мінімального рівня на 15-ту добу з подальшим підвищенням на 20-ту добу на фоні зростаючого дефіциту поживних речовин та накопичення продуктів метаболізму.

Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів в міцелії штамів *Lentinula edodes* знаходиться на значно вищому рівні, ніж у дослідженого штаму *Flammulina velutipes*.

Більші значення показників росту виявлені у культур з меншим рівнем інтенсивності ПОЛ. Прикладом можуть бути такі штами *Lentinula edodes*: зі значною біомасою та низьким рівнем інтенсивності ПОЛ – штам 340, і навпаки, у штаму 511 був встановлений найвищий рівень перекисних процесів та найнижча біомаса.

Вміст ТБК-АП в культуральному фільтраті усіх штамів є меншим у порівнянні з вмістом активних продуктів до тіобарбітурової кислоти для міцелію.

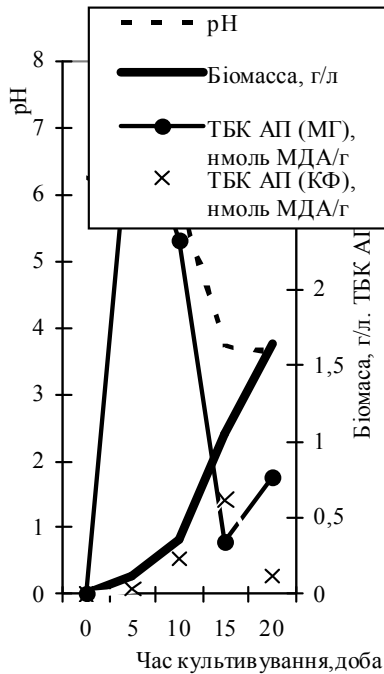


Рис. 1. Динаміка росту та вмісту малонового діальдегіду штаму 340 *Lentinula edodes*

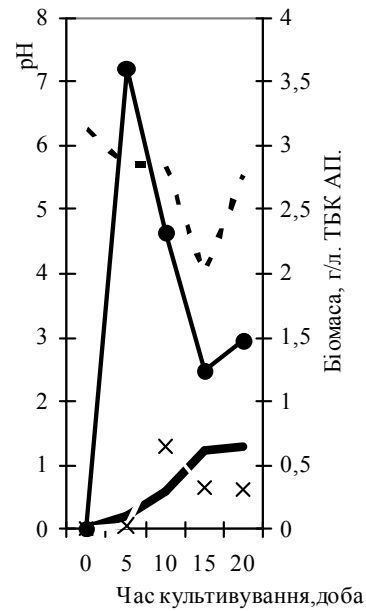


Рис. 2. Динаміка росту та вмісту малонового діальдегіду штаму 511 *Lentinula edodes*

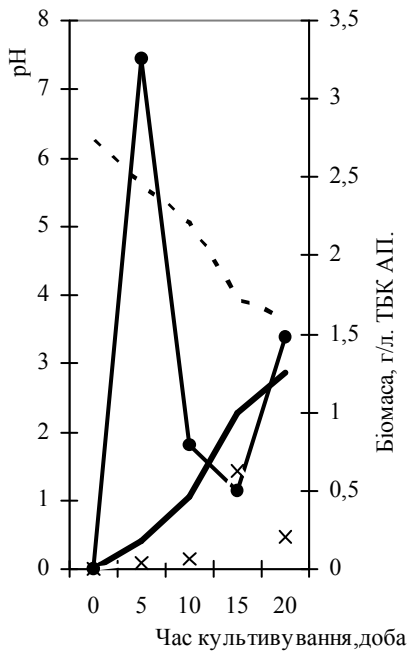


Рис. 3. Динаміка росту та вмісту малонового діальдегіду штаму 523 *Lentinula edodes*

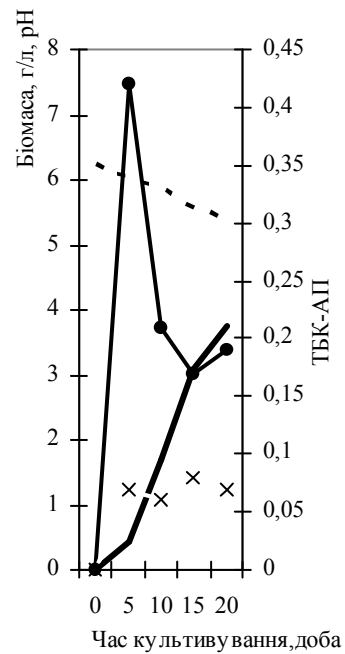


Рис. 4. Динаміка росту та вмісту малонового діальдегіду штаму F-06 *Flammulina velutipes*

**Висновки.** Таким чином, динаміка перекисного окиснення ліпідів досліджених штамів їстівних лікарських грибів *Lentinula edodes* та *Flammulina velutipes* характеризується підвищенням вмісту продуктів пероксидації до максимуму на початкових фазах культивування, потім відбувається зниження їхнього вмісту до мінімального рівня, і наприкінці культивування – підвищення концентрації ТБК-АП. Причому вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів в міцелії досліджених штамів *Lentinula edodes* знаходиться на значно вищому рівні, ніж у *Flammulina velutipes*. Більші значення показників росту виявлені у культур з меншим рівнем інтенсивності ПОЛ. Вміст ТБК-АП в культуральному фільтраті усіх штамів є меншим у порівнянні з таким для міцелію.

## РЕЗЮМЕ

В даному дослідженні вивчалась і порівнювалась динаміка перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) штаммов грибів *Lentinula edodes* і *Flammulina velutipes* в залежності від часу культивування. Інтенсивність ПОЛ визначали за допомогою тесту з тиобарбітуровою кислотою. Аналіз експериментального матеріалу показує, що кожен штамм має індивідуальні характеристики ПОЛ, а біохімічні показники і вміст малонового діальдегіда (МДА) в мицелії штаммів і культуральному фільтраті закономірно змінюються в ході культивування.

## SUMMARY

At given research was studied and compared the peroxide lipid oxidation (PLO) process strains of mushrooms *Lentinula edodes* and *Flammulina velutipes* depending on time of cultivation. The intensity of PLO was determined by the test with thiobarbituric acid. The analysis of experimental material is showing that each strain has individual characteristics of PLO and biochemical parameters, and content of malonic dialdehyde (MDA) in the mycelium of strains and culture filtrate naturally change during cultivation.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А.Владимиров, А.И.Арчаков. – М.: Наука. 1972. – 252 с.
2. Корж Е.В. Перекисное окисление липидов: причина или следствие / Е.В.Корж, В.В.Мухин, Е.Е.Латышев, Е.А.Асланова // Вестник неотложн. и восст. медицины. – 2003, – Т. 4. – №2. – С. 347-350.
3. Лукьянова Л.Д. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние / Л.Д.Лукьянова, Б.С.Балмуханова, А.Г.Уголев. – М.: Наука. 1982. – 187 с.
4. Halliwell B. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy / B. Halliwell, J.M.C.Gutteridge // Lancet. – 1984. № 3. – P. 1396-1398.
5. Кашулина А.П. Роль перекисного свободнорадикального окисления в патологии и методы его изучения / А.П.Кашулина, Е.Н.Сотникова // Мед. консультація. – 1996, – №2, – С. 20-24.
6. Бобырев В.Н. Специфичность систем антиоксидантной защиты органов и тканей – основа дифференцированной фармакотерапии антиоксидантами / В.Н.Бобырев, В.Ф.Почернява, С.Г.Стародубцев // Эксперим. и клин. фармакология. – 1994. – Т. 57(1). – С. 47-54.
7. Богач П.Г. Структура и функции биологических мембран / П.Г.Богач, М.Д.Курский, Н.Е.Кучеренко, В.К.Рыбальченко. – К.: Вища школа, 1981. – 336 с.
8. Казимирко В.К. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия / В.К.Казимирко, В.И.Мальцев, В.Ю. Бутылин, Н.И. Горобец. – К.: Морион, 2004. – 160 с.
9. Esterbauer H. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL / H. Esterbauer, J.Gebicki, H. Puhl, G. Jurgens // Free Radic. Biol. Med. – 1992. – № 13. – P. 341-390.
10. Белова Н.В. Перспективы использования биологически активных соединений высших базидиомицетов / Н.В.Белова // Микол. и фитопатол. – 2004. – Т. 38. – Вып. 2. – С. 1-6.
11. Афанасьева М.М. Подбор целлюлозо- и лигнинразрушающих грибов для применения их в системе замкнутого экологического цикла / М.М. Афанасьева, Р.М. Кадыров // Микол. и фитопатол. – 1980. – 14. – № 5. – С. 410-416.
12. Бисько Н.А. Лекарственные грибы – для здоровья и красоты / Н.А.Бисько, Н.Ю.Митропольская, Э.Ф.Соломко. – К.: ин-т ботаники, 2003. – 40 с.
13. Бухало А.С. Базидіальні макроміцети з лікарськими властивостями / А.С.Бухало, Е.Ф.Соломко, Н.Ю.Митропольская // Укр. ботан. журн. – 1996. – 53. – № 3. – С. 192-201.
14. Билай В.И. Физиологические основы жизнедеятельности грибов в почве / В.И.Билай. – К.: Наук. думка, 1975. – С. 4-6.
15. Бадалян С.М. Основные группы терапевтически значимых метаболитов медицинских грибов / С.М. Бадалян // Пробл. мед. микол. – 2001. – Т. 3, – № 1. – С. 25-32.
16. Капич А.Н. Антиоксидантные свойства дереворазрушающих базидиомицетов / А.Н.Капич, Л.Н.Шишкина // Микол. и фитопатол. – 1992. – 26, – № 6. – С. 486-492.
17. Дворнина А.А. Базидиальные съедобные грибы в искусственной культуре / А.А.Дворянина. – Кишинев: Штиинца, 1990. – 111 с.
18. Дудка И.А. Грибы. Справочник миколога и грибника / И.А. Дудка, С.П.Вассер. – К.: Наук. думка, 1987. – 535 с.
19. Федотов О.В. Ріст та інтенсивність перекисного окиснення ліпідів культур сїтаке *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. / О.В.Федотов, О.В.Чайка // Інтродукція та захист рослин у ботанічних садах та дендропарках. Матеріали Міжнародної наукової конференції (Донецьк, 5-7 вересня). – Донецьк, 2006. – С. 282-285.
20. Чайка О.В. Ріст та рівень перекисного окиснення ліпідів штаму F-06 *Flammulina velutipes* (Curt. ex Fr.) Sing. / О.В.Чайка, О.В.Федотов // Охорона навколишнього середовища та раціональне використання природних ресурсів. Матеріали VI Міжнародної наукової конференції (Донецьк, 17-19 квітня). – Донецьк, 2007. – С. 220-221.
21. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии. Справочник / И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская. – К.: Наук. думка, 1982. – 550 с.
22. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д.Стальная, Т.Г.Гаришвили // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н.Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С.66-68.
23. Приседський Ю.Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів / Ю.Г.Приседський. – Донецьк: Кассиопея, 1999. – 210 с.

Надійшла до редакції 05.05.2010 р.