

**АФК-ІНГІБУЮЧА АКТИВНІСТЬ ЕТАНОЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ
ГРИБІВ *HERICIUM ALPESTRIS*, *HERICIUM ERINACEUS***

**Дипломна робота
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)**

Виконала:

студентка 4 курсу, 400 А група

Куцак Олександра Олександрівна

Керівник:

кандидат біологічних наук,

доцент **Волощук О.М.**

АНОТАЦІЯ

Бакалаврська робота присвячена дослідженню супероксид- та гідроксил-інгібуючій активності спиртових екстрактів грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus*.

Показано, що 70% спиртові екстракти грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus* виявляють високу супероксид-інгібуючу активність, при цьому супероксид-інгібуюча активність зростає з підвищенням концентрації екстракту. Найвища супероксид-інгібуюча активність характерна для екстрактів грибів з концентрацією 0,5 мг/мл, водночас достовірної різниці між супероксид-інгібуючою активністю *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus* не виявлено.

Гідроксил-інгібуюча активність 70% спиртових екстрактів грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus* підвищується із зростанням концентрації екстрактів, при цьому достовірної різниці між досліджуваними грибами не виявлено. Найвищу гідроксил-інгібуючу активність виявляють екстракти досліджуваних грибів у концентрації 0,5 мг/мл.

Отже, гриби *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus* є перспективними джерелами для отримання антиоксидантних сполук для корекції наслідків оксидативного стресу.

Ключові слова: спиртові екстракти, *Hericium alpestris*, *Hericium erinaceus*, супероксид, гідроксильний радикал, антиоксидантна активність

ABSTRACT

The bachelor's work is devoted to the study of superoxide- and hydroxyl-inhibiting activity of alcohol extracts of *Hericium alpestris* and *Hericium erinaceus* mushrooms.

It was shown that 70% alcohol extracts of *Hericium alpestris* and *Hericium erinaceus* show high superoxide-inhibiting activity, while superoxide-inhibiting activity increases with increasing concentration of the extract. The highest superoxide-inhibiting activity is characteristic of mushroom extracts with a concentration of 0.5 mg/ml, while no significant difference between the superoxide-inhibiting activity of *Hericium alpestris* and *Hericium erinaceus* was found.

Hydroxyl-inhibiting activity of 70% alcoholic extracts of *Hericium alpestris* and *Hericium erinaceus* increases with increasing concentration of the extracts, while no significant difference between the studied mushrooms was found. The highest hydroxyl-inhibiting activity was found in the extracts of the studied mushrooms at a concentration of 0.5 mg/ml.

Therefore, *Hericium alpestris* and *Hericium erinaceus* mushrooms are promising sources for obtaining antioxidant compounds to correct the effects of oxidative stress.

Key words: alcohol extracts, *Hericium alpestris*, *Hericium erinaceus*, superoxide, hydroxyl radical, antioxidant activity

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ВСТУП	5
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1. Харчова цінність грибів.....	7
2. Активні форми кисню в клітинному метаболізмі.....	12
3. Методи визначення антиоксидантної активності екстрактів грибів.....	18
РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	21
РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	23
ВИСНОВКИ	27
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	28
ДОДАТКИ	31

ВСТУП

На сьогоднішній день залишаються актуальним питання пошуку природних антиоксидантів. Увагу дослідників привернули гриби роду *Hericium*, а саме *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus*. Лікарські гриби стали привабливою темою через їхній потенціал в галузі медицини та біотехнологій, а саме гриби цього роду мають нейропротекторні, протизапальні та імуномодулюючі ефекти, антибактеріальні та протигрибкові властивості, а також застосовуються в харчовій промисловості [1].

У науковій літературі описані окремі дослідження видів *Hericium*, при цьому краще вивченим є *Hericium erinaceus*. Ці дослідження оцінювали властивості *Hericium erinaceus*, включаючи його потенціал для лікування хвороби Альцгеймера, запалення, алергії, депресія та пошкодження нервів. Ранні дослідження хімічних компонентів видів *Hericium* були зосереджені на полісахаридах, основних активних компонентах, тоді як останні дослідження показали, що компоненти з невеликою молекулярною масою також відіграють важливу роль у різноманітній біологічній активності видів *Hericium*, а саме виявляють антиоксидантну активність. Проте остаточних досліджень на дану тему не проводилось [2].

Hericium alpestris є менш дослідженим грибом із роду *Hericium*, проте сучасні фармакологічні експерименти *in vivo* або *in vitro* на сирих і фракціонованих екстрактах показали, що хімічні компоненти видів всіх *Hericium* мають широкий спектр біоактивності, включаючи нейропротекторну, протимікробну, протипухлинну, антиоксидантну та протизапальну дію [3]. Проте здатність екстрактів грибів роду *Hericium* виявляти супероксид- та гідроксил-інгібуючу активність залишається досі не вивченою.

Метою роботи стало дослідження супероксид- та гідроксил-інгібуючої активностей спиртових екстрактів грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus*.

Для досягнення мети перед нами були поставлені наступні **завдання**:

1. Визначити супероксид-інгібуючу активність 70% етанольних екстрактів грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus*.

2. Дослідити гідроксил-інгібуючу активність спиртових екстрактів грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus*.

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1. Харчова цінність грибів

Дикорослі гриби широко поширені і вважаються популярною делікатесною стравою в багатьох країнах. З давніх часів люди вживали гриби як складову частину щоденного раціону харчування. Гриби накопичують різноманітні вторинні метаболіти, такі як фенольні сполуки, полікетиди, терпени та стероїди [4].

В останні роки їстівні гриби привернули увагу дослідників, так як вони є джерелом антиоксидантів. Їх використовують безпосередньо як харчові добавки для посилення антиоксидантного захисту, для зниження рівня окислювального стресу. Окрім антиоксидантних властивостей, гриби також виявляють протипухлинну, противірусну, антикоагулятивну, протидіабетичну, гіполіпідемічну, гепатопротекторну та імуностимулюючу дію, що дало можливість використовувати їх при виготовленні косметики, у біомедицині, сільському господарстві [4].

На сьогоднішній день відомо багато видів їстівних дикорослих грибів, що ростуть у різних кліматичних та екологічних умовах. Поширені види грибів, які вирощуються у відповідних умовах: *Agaricus spp.*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus spp.*, *Volvariella volvacea*, *Hericium erinaceus*, *Auricularia auricula-judae*, *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum*, *Flammulina velutipes*, *Tremella fuciformis*, *Pholiota nameko*, *Lepista nuda* і *Coprinus comatus*. [4].

У плодових тілах та міцеліях було виявлено антиоксидантні сполуки, такі як фенольні сполуки, флавоноїди, глікозиди, полісахариди, токофероли, ерготіонеїн, каротиноїди та аскорбінова кислота.

У грибах було виявлено різні флавоноїди, наприклад, мирицетин, хризин, катехін, гесперетин, нарингенін, нарингін, формометин, біоханін, пірогалол, ресвератрол, кверцетин, рутин, кемпферол. Аналіз метанольного екстракту *Cantharellus cibarius* показав, що феноли були його основними антиоксидантними компонентами, але за ними йшли флавоноїди, вміст яких становив приблизно 86% від загального вмісту фенолу [5].

Здатність флавоноїдів пригнічувати продукування АФК залежить від наявності та розташування кількох гідроксильних груп у їхній структурі. Подвійний зв'язок і карбонільна група в гетероциклі або полімеризація ядерної структури підсилюють активність, утворюючи більш стабільний флавоноїдний радикал завдяки кон'югації та електронній делокалізації. Механізми дії флавоноїдів, такі як модуляція сигнальних шляхів і регуляція експресії генів, також можуть сприяти їхнім захисним властивостям [6].

Оскільки флавоноїди містять іони металів з перехідною валентністю та мають різну кількість ОН-груп у кільці В, вони також можуть працювати як проокислювачі. Замість того, щоб припинити ланцюгову реакцію, флавоноїдний феноксильний радикал може взаємодіяти з киснем, утворюючи хінони та супероксидний аніон ($O_2^{\cdot-}$). Наявність високих рівнів перехідних іонів металів може спричинити цю реакцію, яка може призвести до небажаного прооксидантного ефекту флавоноїдів [7].

Полісахариди, включаючи полісахаридно-білкові комплекси, є основними біоактивними компонентами їстівних і лікарських грибів. Вони працюють як адаптогени та імуностимулятори. Грибні полісахариди мають імуностимулюючий ефект, який здебільшого є профілактичним, і вони допомагають у лікуванні інфекційних захворювань і метастазів пухлин [8].

Процедура екстракції та метод очищення фракцій полісахаридів значною мірою залежать від виду грибів та фізичних властивостей полісахаридів. Зазвичай ці полісахариди виділяються з гарячого водного екстракту шляхом осадження етанолом без додаткового очищення. Неочищені полісахариди зазвичай очищаються хроматографічними методами, такими як іонообмінна хроматографія, а також ферментативним очищенням із застосуванням целюлаз, амілаз і протеаз. Крім того, повідомлялося про нові методи екстракції, такі як ультразвукова екстракція та процедура екстракції з процесом заморожування-розморожування [9].

Деякі дослідження виявили, що очищені полісахариди грибів мають меншу антиоксидантну активність порівняно з первинними сирими екстрактами. Полісахариди в клітинній стінці грибів можуть утворювати ковалентні (складноєфірні) зв'язки з білками через залишки тирозину та/або ферулової кислоти в результаті деградації лігніну. Проте, інші дослідження показали, що чисті полісахаридні фракції можуть мати вищу антиоксидантну активність. Наприклад, полісахариди з *A. brasiliensis*, отримані шляхом депротейнізації за допомогою пронази, продемонстрували високу антиоксидантну активність проти радикалів $\cdot\text{OH}$ та $\text{O}_2^{\cdot-}$, виміряну методом спіну-уловлювання електронного парамагнітного резонансу (EPR). Ці полісахариди здебільшого склалися з (1 \rightarrow 6)- β -D-глюканів [9].

Грибні полісахариди та глікокон'югати можуть бути корисними для розробки нових ліків або натуральних дієтичних добавок, а також для профілактики та лікування розладів, пов'язаних з окислювальним стресом. Завдяки високій антиоксидантній активності полісахаридів з їстівних грибів, можна запобігти пероксидному окисленню ліпідів та розвитку різних захворювань шлунково-кишкового тракту, таких як пептична виразка, рак шлунково-кишкового тракту та запальні захворювання кишечника, які частково виникають через окислювальний стрес [4].

Про цитотоксичний вплив полісахаридних екстрактів вищих грибів на нормальні клітини до теперішнього часу не відомо. Також було підтверджено, що полісахаридний екстракт *G. lucidum in vitro* стимулює проліферацію клітин трофобласта HTR-8/SVneo, які необхідні для нормальної плацентації, настання вагітності та підтримки росту плоду у людини [11].

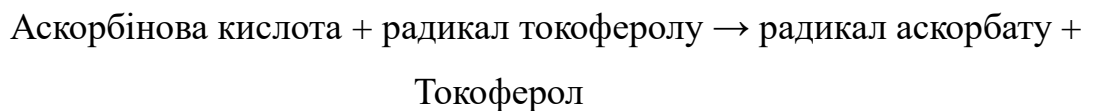
Екстракти полісахаридів виявилися стійкими до високих температур і зберегли значний антиоксидантний потенціал, незважаючи на всі обробки, що застосовувалися під час їх виготовлення. [4].

Вітамін С, відомий як L-аскорбінова кислота, є головним антиоксидантом у плазмі та клітинах. Це життєво важлива поживна речовина для обмеженої кількості видів тварин, зокрема для людей, тому його

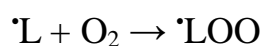
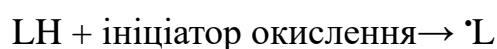
необхідно отримувати з їжею, щоб уникнути потенційно смертельного стану [12].

Вітамін С виявлено в різних їстівних грибах. Його кількісно визначали за допомогою ВЕРХ або спектрофотометричного аналізу на основі реакції з 2,6-дихлорфеноліндофенолом [4].

Аскорбат значно ефективніший в усуненні пероксидного окислення ліпідів, спричиненого ініціатором ліпідного пероксидного радикалу ($\cdot\text{LOO}$), у порівнянні з іншими сполуками, такими як білкові тіоли, урати, білірубін і вітамін Е. У водному середовищі аскорбінова кислота здатна захищати біомембрани від пероксидного окислення, ефективно захоплюючи $\cdot\text{LOO}$ до того, як вони зможуть розпочати пероксидне окислення ліпідів. Крім того, вона може регенерувати вітамін Е, основний жиророзчинний антиоксидант. Аскорбінова кислота швидко взаємодіє з радикалом токоферолу, відновлюючи радикал аскорбату (семідегідроаскорбат) до аскорбату за допомогою NADH-залежної семідегідроаскорбатредуктази [13].



Біологічно найактивнішою формою вітаміну Е є α -токоферол, головна функція якого полягає у захисті клітинних мембран від пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ). α -токоферол припиняє процес ПОЛ, поглинаючи $\cdot\text{LOO}$, але в цьому процесі сам перетворюється на реактивний радикал. Кількість токоферолів, виявлених у їстівних грибах, значно менша, ніж у деяких продуктах, які зазвичай рекомендуються як хороші джерела вітаміну Е. Вміст токоферолів у їстівних грибах коливається від 0,02 до 200 мкг/100 г сухої маси [4].



Каротиноїди є природними пігментами, і в продуктах їх налічується кілька десятків. У харчуванні та організмі людини зустрічаються β -каротин, α -каротин, лікопін, лютеїн і β -криптоксантин. З них β -каротин, α -каротин і β -криптоксантин можуть функціонувати як провітамін А та є важливими джерелами цього вітаміну. Нещодавно особливу увагу було приділено ролі лікопіну в здоров'ї людини, хоча він не має властивостей провітаміну А. Лікопін вважається потужним антиоксидантом, який знешкоджує $O_2^{\cdot-}$. Показано, що лікопін проникає через гематоенцефалічний бар'єр і присутній у центральній нервовій системі в низьких концентраціях [14].

У кількох видах грибів було виявлено β -каротин і лютеїн. Каротиноїди, що містяться в рожево-червоних *Cantharellus cinnabarinus* та оранжевих *Cantharellus friesii*, майже повністю складаються з кантаксантина – пігменту, який також наявний у лососі. Це може пояснити застосування лисичок китайськими травниками для лікування курячої сліпоти. Відомо, що кантаксантин захищає людські тканини від окисного пошкодження та продається як антиоксидант [4].

Каротиноїди можуть взаємодіяти з АФК, стаючи радикалами. Вони виступають як антиоксиданти, які руйнують ланцюг у ліпідному середовищі, особливо за низького парціального тиску кисню. Багато подвійних зв'язків роблять каротиноїди чутливими до атак $\cdot LOO$, що в результаті призводить до утворення продуктів, які неактивні. Залежно від тиску кисню або концентрації каротиноїдів, антиоксидантні властивості каротиноїдів можуть перетворюватися на прооксидантні. Відомо, що β -каротин втрачає свою антиоксидантну активність при збільшенні нормального тиску кисню в оточуючому середовищі та має автокаталітичний прооксидантний ефект, який зростає зі збільшенням концентрації [4].

Вітамін D, як один з жиророзчинних секостероїдів, сприяє підвищенню абсорбції кальцію (Ca), заліза (Fe), магнію (Mg), фосфору (P) і цинку (Zn) в кишечнику. Його важлива роль в підтримці здоров'я кісток, забезпечення гомеостазу кальцію (Ca^{2+}) вже добре вивчена, проте останнім часом

відзначається зростаючий інтерес до його впливу на м'язи, імунну систему, серцево-судинну систему, боротьбу з раком та функцію підшлункової залози. Вітамін D3 отримують із тваринних джерел, тоді як вітамін D2 в основному знаходиться в грибах та дріжджах. Рівень вітаміну D2 у грибах, незалежно від того, чи вони культивуються, чи ростуть у дикому середовищі, значно варіюється в залежності від виду грибів і стадії їх розвитку. Кліматичні умови, середовище існування та географічне положення можуть призвести до змін у вмісті ергокальциферолу в грибах. Наприклад, у *A. bisporus* вміст вітаміну D складає всього 0–3,75 мкг/100 г свіжої маси, тоді як у *L. edodes* він коливається від 0,04 до 21,8–109,6 мкг/100 г сухої маси [15].

2. Активні форми кисню в клітинному метаболізмі

Супероксид – продукт одноелектронного відновлення діоксигену, широко зустрічається в живих системах. Молекулярний кисень (діоксиген) – це дирадикал, що містить два неспарених електрони, а супероксид виникає в результаті додавання електрона, який заповнює одну з двох молекулярних орбіталей, залишаючи заряджену іонну форму з одним неспареним електроном і сумарним негативним зарядом. Його кількість може значно варіюватися в залежності від типу клітини, умов середовища та активності метаболічних процесів. Точне число молекул супероксиду в окремій клітині важко визначити, зазвичай виражають у мікромолярних або наномолярних концентраціях. Супероксид існує в клітині дуже короткий час, більше кількох мікросекунд. Це дуже реактивна молекула, що швидко реагує з іншими речовинами в клітині. Зазвичай він перетворюється на інші види реактивних кисневмісних радикалів або обробляється ферментами антиоксидантної системи клітини [16].

Пероксид водню – це активна форма, сполука, яка має одинарний зв'язок кисень–кисень. Пероксид водню міститься в біологічних системах, включаючи організм людини. Пероксиди, які є реактивними видами кисню (ROS), існують в клітинах дуже короткий час, зазвичай від кількох

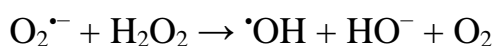
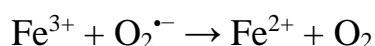
мікросекунд до мілісекунд. Оскільки вони є дуже активними та швидко реагують з біомолекулами, такими як ДНК, білки та ліпіди, клітині необхідно швидко відновлювати рівновагу та нейтралізувати їх за допомогою антиоксидантних систем, щоб уникнути пошкоджень [17].

Гідроксильний радикал, $\cdot\text{HO}$, є нейтральною формою гідроксид-іона (HO^-). Гідроксильний радикал ($\cdot\text{OH}$) є дуже реактивним і короткоживучим у клітині. Зазвичай його життєвий цикл в клітині дуже короткий, від кількох наносекунд до мілісекунд, оскільки він миттєво реагує з найближчими молекулами [18].

На гомеостаз організму впливають багато реактивних форм, такі як АФК, активний азот (RNS), активний вуглець (RCS) і активні форми сульфуру (RSS). АФК представляють найважливіший клас реактивних видів, що утворюються в живих системах. В еукаріотичних клітинах понад 90% АФК виробляється мітохондріями шляхом виходу електронів із мітохондріальної електронотранспортної системи, головним чином від коензиму Q до молекулярного кисню, що призводить до утворення супероксидного аніон-радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$), який називається «первинним». Крім того, супероксид спонтанно або ферментативно може бути дисмутований на пероксид водню (H_2O_2) і O_2 . H_2O_2 не є вільним радикалом, але хімічно більш активний, ніж O_2 , завдяки чому він входить до групи АФК. Він має здатність утворювати більш реакційноздатний $\cdot\text{OH}$ за допомогою комбінації реакцій Фентона та Габера-Вайса [4].



Реакція Фентона



Реакція Габера-Вайса

Нарешті, $\cdot\text{OH}$ взаємодіє ще з одним електроном і протоном, що призводить до утворення молекули води (H_2O). У біологічних системах ця реакція в основному реалізується через приєднання атома водню, який походить від різних сполук, таких як білки та ліпіди, що часто призводить до окиснювального ушкодження цих біомолекул. Крім мітохондріальної електронотранспортної системи, незначні кількості АФК генеруються електротранспортним ланцюгом, розташованими в ендоплазматичному ретикулумі, плазматичних і ядерних мембранах [4].



Рис. 2.1 Класифікація реактивних форм: активні форми кисню (ROS), активні форми азоту (RNS), активні види сірки (RSS) і активні види вуглецю (RCS)

Незважаючи на шкідливий вплив АФК, корисне фізіологічне використання АФК у клітинах зараз демонструється в різних областях. Низькі фізіологічні рівні АФК функціонують як вторинні месенджери у внутрішньоклітинній передачі сигналів і необхідні для нормального функціонування клітин. Було задокументовано, що низькі рівні АФК можуть модулювати клітинну проліферацію, апоптоз і експресію генів через активацію факторів транскрипції, таких як ядерний фактор Каппа В (NF- κ B) і фактор-1 α , індукований гіпоксією (HIF) [4].

Помірне підвищення АФК може захистити від інфекцій, викликаних широким спектром мікроорганізмів. Виробництво $\text{O}_2^{\cdot-}$ і H_2O_2 активованими фагоцитами є класичним прикладом навмисного метаболічного генерування АФК для корисних цілей. Помірні кількості мітохондріальних $\text{O}_2^{\cdot-}$ і H_2O_2 відіграють важливу роль у ряді клітинних сигнальних процесів і можуть

активувати сигнальні шляхи, які сприяють виживанню клітин і стійкості до хвороб завдяки гормезису (стимулююча дія помірних доз стресорів – фізичних чи хімічних чинників, що викликають реакцію стресу.). Генерація $O_2^{\cdot-}$ і H_2O_2 фагоцитами важлива для захисту від різних штамів бактерій і грибів. $O_2^{\cdot-}$ також виробляється кількома типами клітин, крім фагоцитів, включаючи лімфоцити та фібробласти [4].

Крім того, помірне збільшення АФК спостерігається при апоптозі, який елімінує ракові та інші небезпечні для життя клітини. Апоптоз здійснюється за допомогою багатоступінчастого ланцюга реакцій, що виникає в ракових клітинах, у яких АФК виступають тригерами та основними медіаторами [19].

Мітохондрії відіграють вирішальну роль в апоптозі. Апоптичні сигнали сприяють накопиченню білка p53, який запускає вивільнення АФК, цитохрому С та кількох інших регуляторів з мітохондрій. АФК можуть діяти як сигнальні проміжні сполуки для цитокінів, включаючи інтерлейкін 1 (IL-1) і фактор некрозу пухлин (TNF). Члени родини цитокінів TNF, такі як $TNF\alpha$ і ліганд Fas (FasL), відіграють важливу роль у запаленні та імунитеті [4].

Живі організми володіють багаторівневою і складною антиоксидантною системою, яка працює або для усунення АФК, або для мінімізації їх негативного впливу. Основні механізми захисту АФК включають ферментативні та неферментативні системи (рис. 2.3). АФК, які не нейтралізовані, можуть націлюватися на біологічні молекули, такі як ДНК, ліпіди та білки, що може призвести до загибелі або дисфункції клітин і прискореного старіння та захворювань, пов'язаних із віком [20].

До ендогенних ферментативних систем антиоксидантного захисту в організмі, як у внутрішньоклітинному, так і позаклітинному середовищі, належать супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатіонпероксидаза (GPx) і глутатіонредуктаза (Gred) (рис. 3). Еритроцити особливо чутливі до окисних середовищ у всьому тілі і здатні виробляти власні АФК. Однак присутність антиоксидантних ферментів, таких як SOD і CAT,

метгемоглобінредуктази, яка каталізує відновлення метгемоглобіну до гемоглобіну, мінімізує ці процеси [20].

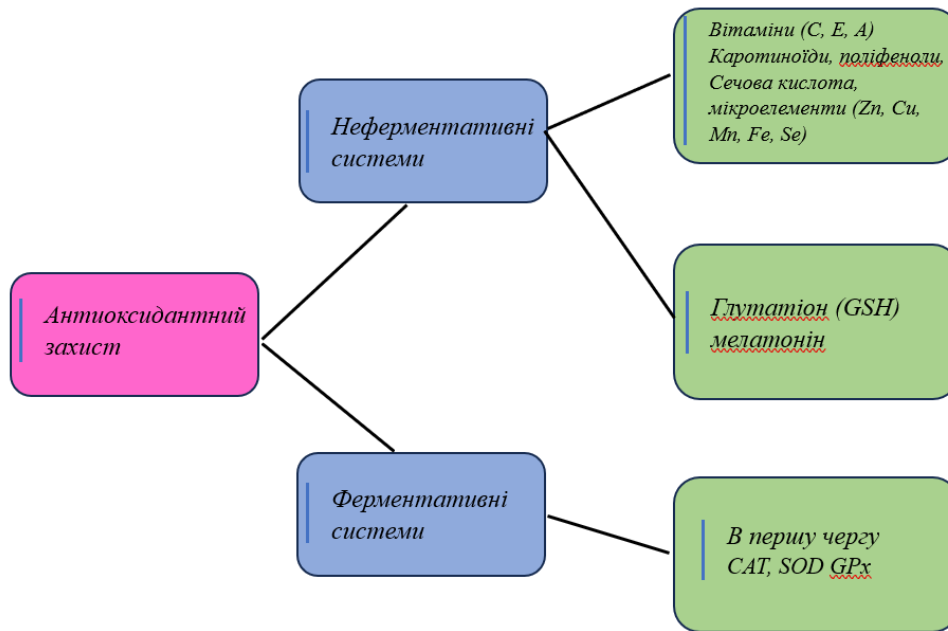


Рис. 2.2 Основні механізми знешкодження АФК в організмі

Неферментативні механізми захисту АФК включають антиоксиданти з низькою молекулярною масою, такі як вітаміни С і Е, каротиноїди, включаючи вітамін А, поліфеноли, сечову кислоту (рис. 2.3) і великі молекули, наприклад, альбумін, церулоплазмін, трансферин, феритин. Крім того, Zn, мідь (Cu), магній (Mn), Fe і Se є ключовими компонентами ферментів з антиоксидантними функціями і позначаються як антиоксидантні мікроелементи. Більшість з них доступні для організму людини як компоненти їжі або харчових добавок [20].

Дуже важливими неферментативними антиоксидантами є глутатіон (GSH), синтезований більшістю живих організмів, і мелатонін. Оскільки мелатонін може безпосередньо проникати через мітохондріальні мембрани, він відіграє дуже важливу роль у захисті мітохондрій від окисного пошкодження. Ймовірно, завдяки антиоксидантній активності мелатонін може покращувати метаболізм глюкози шляхом корекції вироблення інсуліну, захищаючи β -клітини підшлункової залози від пошкодження, викликаного

АФК. Інші гормони, тобто естроген і ангіотензин, також виявляють антиоксидантну активність [4].

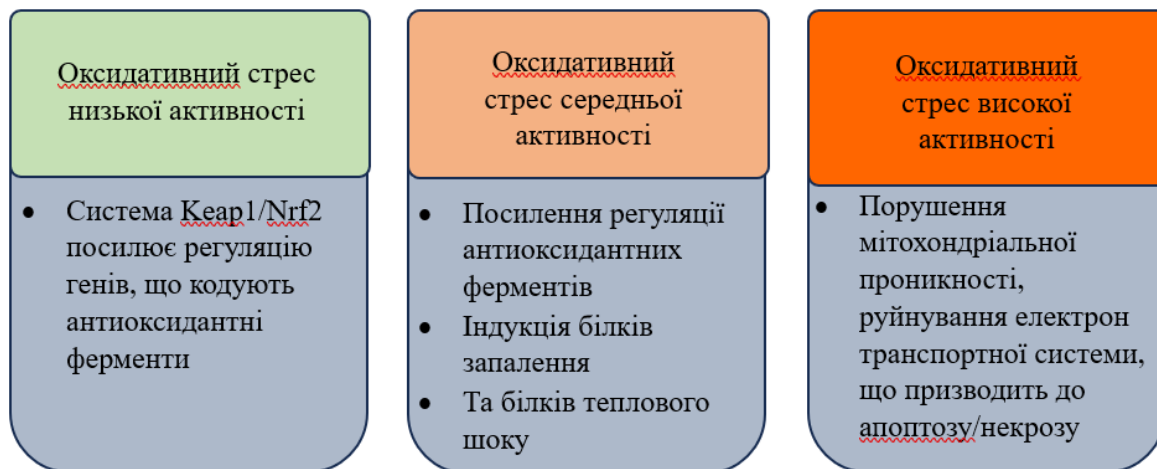


Рис. 2.3 Система адаптивної реакції організму людини і тварин на вплив АФК

При окислювальному стресі у організмі активуються механізми, спрямовані на запобігання або нейтралізацію негативних ефектів АФК. Ці відповіді в основному ґрунтуються на активації антиоксидантів. Організм людини має складну систему адаптаційних реакцій на вплив АФК. Зазвичай він складається з кількох компонентів (рис. 2.4). За високої інтенсивності окисного стресу відбуваються порушення мітохондріальної проникності, активація каскаду апоптозу, руйнування транспортерів електронів, що може завершитися апоптозом та/або некрозом [21].

Підвищення регуляції антиоксидантних систем збільшує їх здатність елімінувати АФК, створюючи таким чином авторегульовану петлю/систему негативного зворотного зв'язку.

3. Методи визначення антиоксидантної активності екстрактів грибів

Існують методи визначення різних показників антиоксидантної активності екстрактів грибів. Наприклад, аналіз вмісту фенолів та флавоноїдів, аналіз здатності нейтралізувати супероксидні радикали,

визначення здатності нейтралізувати DPPH радикали (DPPH-метод) та аналіз активності поглинання гідроксильних радикалів.

Аналіз вмісту флавоноїдів в грибах проводиться за допомогою різних методів, які включають в себе хімічні та хроматографічні техніки. Перш за все необхідно екстрагувати флавоноїди з грибів. Це може бути зроблено за допомогою розчинників, наприклад, етанол, метанол, ацетон, або їх комбінацій. Після екстракції проводиться аналіз екстракту на наявність флавоноїдів. Для визначення загального вмісту флавоноїдів використовуються реагенти, такі як фоліново-цитратний реагент або аміновий реактив.

Хроматографічні методи, такі як тонкошарова хроматографія (ТХ) або високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), можуть використовуватися для окремого визначення різних флавоноїдів у зразках. У цих методах флавоноїди розділяються за допомогою руху розчинника через стовпець або тонкий шар матеріалу, який взаємодіє з флавоноїдами. Також використовується мас-спектрометрія для ідентифікації окремих флавоноїдів, що дозволяє аналізувати масу молекул та їхні фрагменти. Ядерно-магнітна резонансна спектроскопія (ЯМР) дозволяє ідентифікувати та кількісно визначити флавоноїди у зразках [22].

Аналіз поглинання супероксидних радикалів у екстрактах грибів базується на використанні хімічних або біологічних методів для визначення здатності екстрактів нейтралізувати ці радикали. Основний принцип цього тесту полягає в тому, щоб виміряти здатність екстракту грибів до зниження концентрації супероксидних радикалів. Є перелік послідовних кроків, які включені в такий аналіз:

1. Генерація супероксидних радикалів: супероксидні радикали можуть бути згенеровані за допомогою хімічних реакцій, наприклад, за допомогою системи ксантиноксидаза/ксантину.

2. Додавання екстракту грибів: після генерації супероксидних радикалів в систему додається екстракт грибів у різних концентраціях.

3. Вимірювання поглинання радикалів: поглинання супероксидних радикалів екстрактом грибів може бути виміряне за допомогою спектрофотометрії або іншої спектроскопічної техніки. Зменшення або зникнення інтенсивності поглинання вказує на здатність екстракту грибів знижувати концентрацію супероксидних радикалів.

4. Порівняння з контролем: результати вимірювань порівнюються з контрольними зразками, які можуть включати розчинник або інші антиоксиданти з відомою активністю.

5. Обробка даних та аналіз результатів: отримані дані обробляються для визначення концентрації екстракту грибів, необхідної для повного інгібування супероксидних радикалів, що є мірою їхньої антиоксидантної активності [23].

Аналіз активності поглинання гідроксильних радикалів у екстрактах грибів проводиться для визначення їхньої здатності нейтралізувати ці радикали, що свідчить про їхню антиоксидантну активність. Оскільки гідроксильні радикали є дуже реактивними та небажаними сполуками в клітинах, їхня нейтралізація може бути важливою для захисту клітинних структур від окиснення та пошкодження.

Аналіз активності поглинання гідроксильних радикалів включає наступні кроки:

1. Генерація гідроксильних радикалів: гідроксильні радикали можуть бути згенеровані хімічно або фізично, наприклад, за допомогою залучення заліза та пероксиду водню.

2. Додавання екстракту грибів: до системи додається екстракт грибів у різних концентраціях.

3. Вимірювання поглинання радикалів: поглинання гідроксильних радикалів екстрактом грибів вимірюється за допомогою спектрофотометрії або іншої спектроскопічної техніки. Зменшення інтенсивності поглинання сигналу свідчить про здатність екстракту грибів поглинати гідроксильні радикали.

4. Порівняння з контролем.

5. Обробка даних та аналіз результатів.

Цей аналіз допомагає оцінити антиоксидантний потенціал екстрактів грибів на основі їхньої здатності нейтралізувати гідроксильні радикали, які можуть бути потенційно небезпечними для клітинних структур [23].

РОЗДІЛ II. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження антиоксидантної активності екстрактів грибів проводили на базі кафедри біохімії та біотехнології Чернівецького національного університету імені Юрія Федьковича. В роботі досліджено 2 види макроміцетів: *Hericium alpestris*, *Hericium erinaceus*, які були надані національним-природничим парком “Гуцульщина” у рамках договору про співпрацю.

Приготування етанольного екстракту плодових тіл грибів *Hericium alpestris*, *Hericium erinaceus*

Екстракцію проводили згідно з методом, описаним Boonsong et al. [24] із внесеними змінами. Для приготування 70% етанольного екстракту порошкоподібний зразок (5 г) змішували з 50 мл 70% етанолу і струшували при 150 об/хв при кімнатній температурі продовж 24 годин; після чого його центрифугували при 12000 об/хв протягом 15 хв. Супернатант був відфільтрований за допомогою фільтрувального паперу Ватман. Залишок повторно екстрагували за таких самих умов. Отриманий екстракт концентрували під вакуумом при 40 °С на роторному випарнику Labfreez RE-2000E. Одержаний зразок знаходився та зберігався в темному місці при 4 °С.

Аналіз поглинання супероксидних радикалів

До 1 мл екстракту грибів різних концентрацій було додано 0,5 мл нітротетразолієвого синього (0,3 мМ), 0,5 мл NADH (0,936 мМ) та 0,5 мл буферу трис-НСІ (рН 8,0). Після чого суміш інкубували при 25° 5 хвилин. Вимірювали при 560 нм проти холостого зразка. Спирт використовувався як оптичний контроль, куркумін – як стандарт. Розрахунки проводились за формулою:

$$(\%) = [(Abs_{\text{контроль}} - Abs_{\text{зразок}}) / Abs_{\text{контроль}}] \times 100, \text{ де}$$

$Abs_{\text{контроль}}$ – абсорбція неосвітленої реакційної суміші

$Abs_{\text{зразок}}$ – абсорбція екстракту гриба, доданого до реакційної суміші [23].

Аналіз поглинання гідроксильних радикалів

1 мл реакційної суміші, до якої входять 100 мкл 2-дезоксид-рибози (28 мМ у 20мМ буфері KH_2PO_4 - KOH рН 7,4), 100 мкл екстракту гриба різних концентрацій, 200 мкл EDTA (1,04 мМ), 200 мкл $FeCl_3$, 100 мкл H_2O_2 (1 мМ) та 100 мкл аскорбінової кислоти (1мМ), інкубували при 37° 1 годину. Після чого до 1 мл реакційної суміші додали 1 мл 1% тіобарбітурову кислоту та 1 мл 2,8 % трихлороцтової кистоти. Потім інкубували при $100^\circ C$ 20 хвилин та центрифугували 5 хв при 4000g. Вимірювали після охолодження при 532 нм проти холостого зразка. Кверцетин використовувався як стандарт, спирт – як холостий зразок. Розрахунок проводився за формулою:

$$(\%) = [(Abs_{\text{контроль}} - Abs_{\text{зразок}}) / Abs_{\text{контроль}}] \times 100, \text{ де}$$

$Abs_{\text{контроль}}$ – абсорбція неосвітленої реакційної суміші

$Abs_{\text{зразок}}$ – абсорбція екстракту гриба, доданого до реакційної суміші

[25].

Статистична обробка результатів

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням стандартних методів варіаційної статистики, використовуючи t-критерій Стьюдента. За вірогідні приймали відмінності між групами при $P \leq 0,05$.

РОЗДІЛ III. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Окислювальний стрес, викликаний незбалансованим метаболізмом і надлишком активних форм кисню (АФК), призводить до ряду розладів здоров'я людини. Ендогенні механізми захисту від прооксидантів і споживання антиоксидантів з їжею потенційно регулюють наш окислювальний гомеостаз. Сьогодні перевага надається природним антиоксидантам через те, що антиоксиданти, створені штучно, мають здатність за певних умов викликати несприятливу токсичну дію на організм людини, наприклад, є негативний вплив на регуляцію активності мітоген-активованої протеїнкінази залежно від дозування. Їстівні гриби можна використовувати безпосередньо для посилення антиоксидантного захисту за допомогою дієтичних добавок для зниження рівня окислювального стресу. Повідомлялося, що цілий ряд їстівних грибів має антиоксидантну активність. Відомо, що екстракти грибів містять багато компонентів, кожен з яких має свою специфічну біологічну дію.

Гриби роду *Hericium*, дикі чи штучно вирощені, мають значні антиоксидантні властивості завдяки своїм біологічно активним сполукам, таким як поліфеноли, полісахариди, вітаміни, каротиноїди та мінерали [11].

Результати проведених досліджень показали, що 70% спиртові екстракти грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus* виявляють високу супероксид-інгібуючу активність (рис. 3.1). При цьому супероксид-інгібуюча активність зростає з підвищенням концентрації екстракту: найвища супероксид-інгібуюча активність характерна для екстрактів грибів з концентрацією 0,5 мг/мл. Слід відмітити, що достовірної різниці між супероксид-інгібуючою активністю *Hericium alpestris* і *Hericium erinaceus* не виявлено.

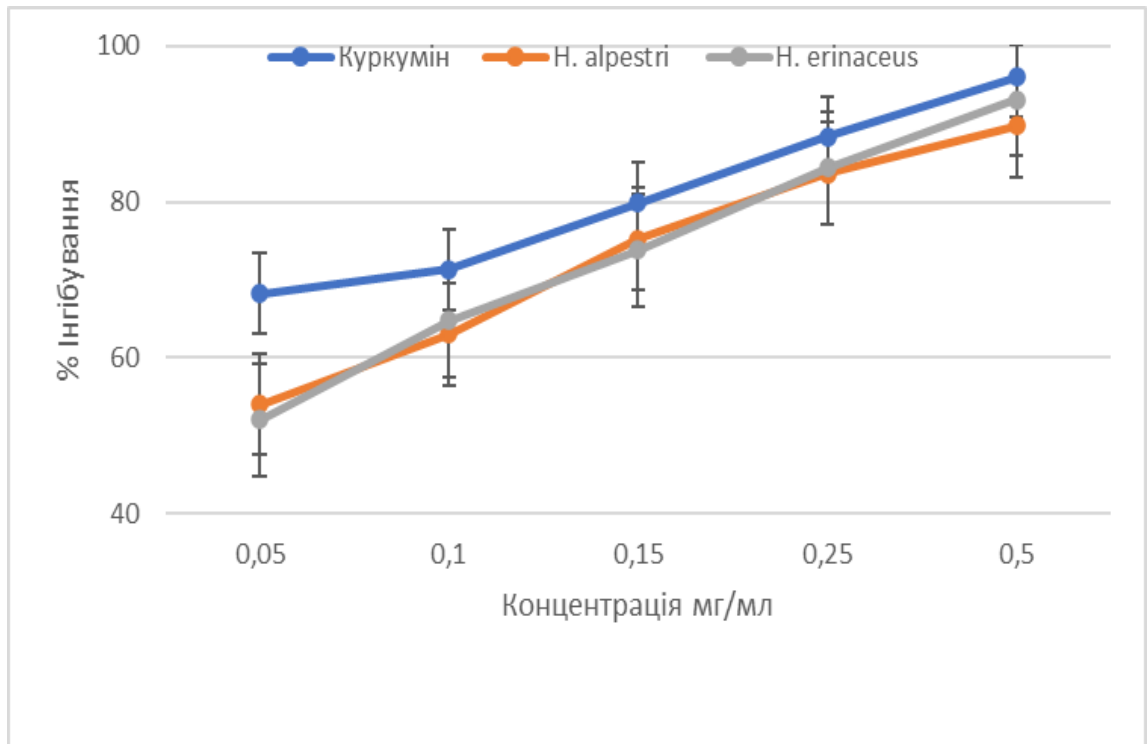


Рис. 3.1. Супероксид-інгібуюча активність 70% етанольних екстрактів грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus*

Супероксид є ключовою молекулою, оскільки із нього утворюються різні активні форми кисню, які мають значний вплив на клітинні функції та здоров'я, наприклад, пероксид водню H_2O_2 , гідроксил-радикал $\cdot\text{OH}$, пероксинітрит $\cdot\text{ONOO}$, синглетний молекулярний кисень $^1\text{O}_2$. Отже, елімінація супероксиду є надзвичайно важливою для організму. Антиоксидантні системи організму, включаючи ферменти, такі як супероксиддисмутаза, каталаза і глутатіонпероксидаза, відіграють ключову роль у регулюванні рівнів АФК і захисті клітин від окислювального стресу [26].

Супероксид-інгібуюча активність залежить від кількох факторів, а саме:

1. Умови середовища: потрібний рН для дії ферментів, концентрація кисню та температура – чим вище значення цих факторів, тим більше утворення супероксиду.

2. Наявність металопротейнів (трансферин і феритин): білки, які зв'язують залізо, запобігають участі заліза у реакціях Фентона.

3. Наявність маломолекулярних антиоксидантів, таких як аскорбінова кислота, токоферолі, глутатіон, які здатні нейтралізувати та запобігають утворенню супероксиду [27].

Водночас нами було визначена гідроксил-інгібуюча активність етанольних екстрактів грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus*. Відомо, що гідроксильний радикал є найреактивнішим, тому не існує специфічних ензимів, які здатні його нейтралізувати. Проте існують ензимні системи, які здатні опосередковано знизити утворення гідроксил-радикали, нейтралізуючи його попередника, а саме супероксид $O_2^{\cdot-}$. До основних ферментів даних систем входять: супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза, пероксидази, феритин та інші металоз'язувальні білки. Також вітамін С, вітамін Е та глутатіон відіграють роль антиоксидантів [27].

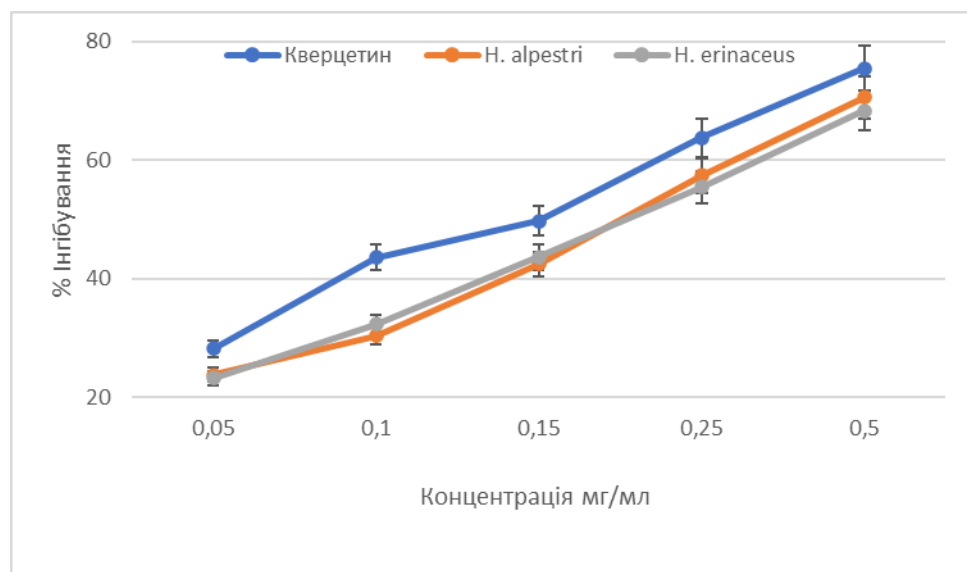


Рис. 3.2. Гідроксил -інгібуюча активність 70% етанольних екстрактів грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus*

Через те, що гідроксил-радикал є одним із найбільш руйнівних форм АФК, він може взаємодіяти із будь-якими компонентами клітини, завдаючи окислювального стресу. Основними мішенями в клітині є ліпіди, білки, вуглеводи та ДНК. Як наслідок порушуються клітинні функції (метаболізм, сигнальна функція клітин, реплікація ДНК), з'являються запальні реакції та відбувається загибель клітин [28].

Показано, що гідроксил-інгібуюча активність підвищується із зростанням концентрації екстрактів, при цьому достовірної різниці між досліджуваними грибами не виявлено (рис. 3.2). Найвищу гідроксил-інгібуючу активність виявляють екстракти досліджуваних грибів у концентрації 0,5 мг/мл.

Отже, проведені дослідження показали, що 70% етанольні екстракти грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus* виявляють високу антиоксидантну активність, тоді як досліджувані гриби є перспективними джерелами для отримання антиоксидантних сполук для корекції наслідків оксидативного стресу.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що 70% спиртові екстракти грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus* виявляють високу супероксид-інгібуючу активність, при цьому супероксид-інгібуюча активність зростає з підвищенням концентрації екстракту. Найвища супероксид-інгібуюча активність характерна для екстрактів грибів з концентрацією 0,5 мг/мл, водночас достовірної різниці між супероксид-інгібуючою активністю *Hericium alpestris* та не виявлено.

2. Показано, що гідроксил-інгібуюча активність 70% спиртових екстрактів грибів *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus* підвищується із зростанням концентрації екстрактів, при цьому достовірної різниці між досліджуваними грибами не виявлено. Найвищу гідроксил-інгібуючу активність виявляють екстракти досліджуваних грибів у концентрації 0,5 мг/мл.

Отже, гриби *Hericium alpestris* та *Hericium erinaceus* є перспективними джерелами для отримання антиоксидантних сполук для корекції наслідків оксидативного стресу.