



БІЯЛОГІЯ

УДК 577.32.579:664.951

ПОТЕНЦІАЛЬНІ ІСТОЧНИКИ АНТИОКСИДАНТОВ ІЗ БІОРЕСУРСОВ БЕЛОРУССКОГО ПООЗЕРЯ

Т.А. Толкачёва*, Н.С. Кисилевская*, А.А. Чиркин*, А.В. Кунцевич**

*Учреждение образования «Витебский государственный

университет имени П.М. Машерова»

**Белорусский государственный университет

Благодаря антиоксидантной активности собственных метаболитов у различных организмов происходит адаптация к изменяющимся условиям среды обитания. Установление антиоксидантной активности в биологических жидкостях беспозвоночных животных и водных экстрактов растений Белорусского Поозерья особенно актуально, так как эта территория Республики Беларусь более чистая по радиационному загрязнению в сравнении с другими регионами. В связи с необходимостью создания эффективных композиций, препятствующих развитию последствий окислительного стресса, важен поиск потенциальных источников для выделения веществ, обладающих антиоксидантными свойствами.

Цель исследования — установление антиоксидантной активности в экстрактах растений, в гомогенате расплода пчел, в гемолимфе виноградных улиток, гемолимфе гусениц и куколок китайского дубового шелкопряда, а также в экстракте куколок китайского дубового шелкопряда.

Материал и методы. Антиоксидантную активность оценивали классическим химическим методом, который связан с регистрацией активных кислородных метаболитов, генерируемых ферментами клеток нейтрофилов крови человека при их активации различными способами (адгезии к поверхности, действии хемотаксического трипептида fMLP и латекса). У растений моделировали окислительный стресс действием неблагоприятных температур и солей тяжелых металлов, после чего фиксировали содержание продуктов перекисного окисления липидов и концентрацию антиоксидантных ферментов.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что из 25 проанализированных растений наибольшими антиокислительными свойствами обладают водные экстракты зверобоя, лабазника и руты. Доказано, что содержимое расплода пчел оказывает ингибирующее действие на процессы окисления в системе, содержащей пероксидазу, и в системе, содержащей активированные нейтрофилы. Результаты анализов показали, что антиоксидантная активность гемолимфы куколок дубового шелкопряда существенно выше по сравнению с гемолимфой гусениц V возраста, гемолимфой виноградных улиток и гомогенатом расплода пчел. Экстракт, полученный из куколок китайского шелкопряда, проявил протекторные свойства по защите растений от стресса, вызванного действием высоких и низких температур и солей меди(II) и свинца.

Заключение. У представителей растительного и животного мира Белорусского Поозерья выраженность антиоксидантной активности распределена в последовательности: гемолимфа куколок китайского дубового шелкопряда > гемолимфа гусениц шелкопряда V возраста > гемолимфа виноградных улиток > гомогенат расплода пчел > экстракты лекарственных растений. Биоресурсы Белорусского Поозерья, включая культивируемые искусственно виды, обладают перспективным потенциалом для производства антиоксидантных препаратов на их основе.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, растения, расплод пчел, гемолимфа шелкопряда, гемолимфа улиток, хемилюминесценция.

POTENTIAL ANTIOXIDANT SOURCES FROM BIO RESOURCES OF BELARUSIAN POOZERIYE (LAKE DISTRICT)

T.A. Tolkacheva*, N.S. Kisilevskaya*, A.A. Chirkin*, A.V. Kuntsevich**

*Education Establishment "Vitebsk State P.M. Masherov University"

**Belarusian State University

Due to antioxidant activities of various organisms' own metabolites the adaptation to the changing habitats takes place. Identification of the antioxidant activities in biological liquids of Belarusian Poozeriye invertebrates and plant water extracts is relevant since this territory of the Republic of Belarus is more clean from the point of view of radiation pollution in comparison to other territories. The necessity for the creation of efficient compositions, which prevent the development of the consequences of oxidative stress, dictates the significance of the search for potential sources of the extraction of substances which have antioxidant properties.

The research purpose is to identify antioxidant activities in plant extracts, in bee brood homogenate, in grape snail hemolymph, caterpillar and Chinese oak silkworm pupae hemolymph as well as in Chinese oak silkworm pupae extract.

Material and methods. Antioxidant activity was assessed by the classical chemical method which is connected with the registering of active oxygen metabolites generated by cell enzymes of human blood neutrophils activated by various ways (adhesion to the surface, chemotactic tripeptide fMLP activity and latex). Oxidative stress was modeled in plants by the impact of unfavorable temperatures and heavy metal salts, after which the contents of products of peroxidation of lipids and concentration of antioxidant enzymes was identified.

Findings and their discussion. It was found out that of the 25 plants under study tutsan, meadowsweet and rue water extracts possess strongest antioxidative properties. It was proved that the contents of bee brood causes inhibiting action on the oxidation processes in the system which contains peroxidase as well as in the system which contains activated neutrophils. The analysis results showed that antioxidant activity of oak silkworm pupae haemolymph is considerably higher compared to the V-age caterpillar haemolymph, grape snail haemolymph and bee brood homogenate. The extract received from the Chinese oak silkworm pupae exhibited protective properties in defending the plants from stress caused by high and low temperatures and copper (II) and lead salts.

Conclusion. Representatives of the flora and fauna of Belarusian Poozeriye exhibit antioxidant activities in the following succession: Chinese oak silkworm pupae hemo lymph > V-age silkworm caterpillar haemolymph > grape snail haemolymph > bee brood homogenate > herb extracts. Bio resources of Belarusian Poozeriye, including artificially cultivated species, possess a prospective potential for the production of antioxidants on their basis.

Key words: antioxidant activities, plants, bee brood, silkworm haemolymph, snail haemolymph, chemiluminiscence.

В северо-западной части Республики Беларусь находится уникальный природный регион нашей страны — Белорусское Поозерье. Эта территория представляет собой место с прозрачно-зеркальными озерами, не тронутыми человеком лесными массивами и холмистыми ландшафтами, сохранившими свою природную чистоту. Не менее уникальными являются экосистемы и биоресурсы Белорусского Поозерья, их изучение в качестве источников антиоксидантов остается актуальным.

Термин «антиоксидантный метаболом» был введен и стал применяться во втором десятилетии XXI века с целью описания низкомолекулярных метаболитов в антиоксидантной системе растений. Их основная функция — защита от разрушающего действия окислительного стресса и формирование систем антиоксидантной устойчивости, которые определяются как генотипом, так и факторами среды [1]. Проведенные недавно исследования доказывают, что фитохимические вещества, обнаруженные в растениях, отвечают за их мощную антиоксидантную активность (полифенолы, дубильные вещества, антоцианы и многие другие антирадикальные компоненты) [2]. Антиоксиданты вступают во взаимодействие со свободными радикалами и прекращают их разрушительное действие. Принято, что к свободным радикалам относят: гидроксильный радикал, супероксидный анион-радикал, гидропероксильный радикал, липидный радикал, липидный пероксильный радикал, алкоксильный радикал, монооксид- и диоксид-азотные радикалы и др. Антиоксиданты, нивелирующие эффекты свободных радикалов, принято делить на две большие группы: ферментативные и неферментативные. В свою очередь, ферментативные антиоксиданты бывают двух типов: 1) первичные — супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза; 2) вторичные — глутатионредуктаза, глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа. Неферментативные антиоксиданты представляют собой группы молекул: фенольные кислоты — гидроксикоричные (феруловая, кумаровая) и гидроксибензойные (галловая, элаговая); флавонолы (кверцетин, кемпферол); изофлавоноиды (генистин); флавоноиды (катехин,

пелагонидин); flavаноны (гесперидин); антоцианидины (цианидин, дельфинидин); кофакторы (коэнзим Q10); минералы (цинк, селен); сероорганические соединения (аллилсульфид, индолы); витамины и их производные (витамины A, C, E и K; каротиноиды, ликопин, лютеин, зеаксантин, бета-каротин; мочевая кислота) [1–3].

Окислительный стресс — относительно новое понятие, широко используемое в биологии и медицине в последние три десятилетия. Он является причиной некоторых физиологических изменений и очень распространенных заболеваний у человека и нарушений обмена веществ у живых организмов. Доказано, что в обычных условиях скорость и периодичность образования окислителей коррелируют со скоростью их удаления. При этом потеря баланса между прооксидантами и антиоксидантами приводит к развитию окислительного стресса и впоследствии к связанным с ним патологиям. Содержание и активность эндогенных факторов антиоксидантного действия проверяют с помощью тестов для их оценки. Во-первых, это тесты, основанные на переносе атома водорода (ORAC — тест на способность к поглощению кислородных радикалов, HORAC — тест на антиоксидантную способность гидроксильных радикалов, TRAP — тест на общий антиоксидантный параметр улавливания пероксильных радикалов и TOSC — тест на общую способность улавливать оксирадикалы). Тесты, связанные с переносом одного электрона, включают тест, восстанавливающий антиоксидантную способность меди (CUPRAC), тест, восстанавливающий антиоксидантную способность железа (FRAP), и тест Фолина — Чиокальтеу, связанный с антиоксидантными свойствами фенольных соединений. Существуют и смешанные тесты, работающие на основе фиксации переноса как атома водорода, так и электрона: тест с 2,2'-азинобис-(3-этилбензоизоцелюл-6-сульфоновой кислотой (ABTS) и тест [2,2-ди(4-трет-октилфенил)-1-пикрилгидразил] (DPPH) тест. Они служат для проведения антиоксидантного анализа и находят применение для установления антиоксидантной активности многокомпонентных образцов. В описанных выше методах требуются идентификация и уточнение (методы на основе электрохимических биологических сенсоров). Сочетание химических и электрохимических методов позволяет установить механизмы действия и кинетики протекания процессов одновременно с несколькими антиоксидантами [3].

Другим подходом оценки антиоксидантной активности у живых организмов служит установление функционирования клеток млекопитающих, которые предназначены для борьбы с окислительным стрессом и его последствиями. Активированные различными способами нейтрофилы крови человека могут генерировать ферментативным образом продукты с высокой реакционной способностью благодаря ферментам НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы (МПО). Данные ферменты последовательно формируют активированные формы (метаболиты) кислорода и галогенов (O_2^- , H_2O_2 , $\cdot OH$, $HOCl$, $HOBr$), окисляющие многие важные для жизни биомолекулы. Известно, что эти оксидазы активируются при действии на нейтрофилы бактериальных пептидов, белков острой фазы воспаления, некоторых провоспалительных цитокинов, адгезионных молекул и индукторов фагоцитоза. Указанный подход был разработан на кафедре биофизики БГУ под руководством академика С.Н. Черенкевича, что позволило на базе научно-исследовательской лаборатории совместно с сотрудниками кафедры биофизики проводить анализ антиоксидантного статуса представителей биоты Белорусского Поозерья [4; 5].

Актуальным остается поиск биологического материала, обладающего высокой антиоксидантной активностью для выделения, очистки и применения биологически активных веществ, отвечающих за антиокислительную способность.

Цель исследования — установление антиоксидантной активности в экстрактах растений, в гомогенате расплода пчел, в гемолимфе виноградных улиток, гемолимфе гусениц и куколок китайского дубового шелкопряда, а также в экстракте куколок китайского дубового шелкопряда.

Материал и методы. В работе использовали биологический материал растительного и животного происхождения. Определение содержания фенольных соединений и биофлавоноидов проводили в спиртовых экстрактах, а оценку антиоксидантной активности — в водных экстрактах из растительного сырья по общепринятым методам [6]. Получение спиртовых растительных экстрактов: 500 мг измельченного растительного сырья заливали 10 см³ 96% этанола и оставляли в темном месте на ночь. Затем полученный экстракт сливали, а материал заливали 10 см³ 70% этанола и кипятили на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Экстракцию повторяли три раза, полученные экстракты объединяли, фильтровали и доводили объем до 50 см³ 70% этанолом.

Для приготовления водных экстрактов растений 100 мг измельченного растительного сырья заливали 20 см³ дистиллированной воды и выдерживали на кипящей водяной бане 15 минут. Настаивали в течение 1 часа при комнатной температуре и фильтровали, получая в результате прозрачные желто-вато-коричневые экстракты без мутных примесей.

Гемолимфу виноградных улиток отбирали из отверстия, проделанного во втором завитке от входа в раковину. Гемолимфу куколок дубового шелкопряда получали из надреза в конце брюшка куколки путем надавливания на тело. Разделение выделенной из куколок шелкопряда гемолимфы на фракции проводили на колонке Sephadex G25 fine. Гомогенат расплода пчел готовили из личинок трутней, которых извлекали из сот, и подвергали гомогенизации с добавлением адсорбента — смеси лактозы и глюкозы, затем тщательно растирали, гомогенат хранили при температуре 4–6°C.

Для определения *in vitro* антиоксидантного потенциала исследуемых биологических жидкостей применяли системы, инициирующие появление свободных радикалов и активных кислородных метаболитов (АКМ) в модели, их регистрировали по следующим реакциям:

- реакция Фентона (взаимодействие FeSO₄ с H₂O₂ и образование гидроксильного радикала), метод хемилюминесценции (ХЛ);
- окисление люминола пероксидазой хрена в присутствии H₂O₂, метод ХЛ;
- генерация активных кислородных метаболитов нейтрофилами крови человека при адгезии, фагоцитозе при действии хемотаксического трипептида и латекса (ХЛ);
- галогенирование люминола при действии OCl⁻, люминол-зависимая ХЛ.

Нейтрофилы лейкоцитов человека получали из крови доноров-добровольцев, используя фикол-урографиновый метод. Исследования по выявлению и регистрации хемилюминесценции в разных биологических жидкостях проведены на кафедре биофизики БГУ. Для количественного определения генерации нейтрофилами АКМ суспензию с ними (1·10⁶ клеток/мл) помещали в стеклянную кювету, добавляли исследуемую жидкость, люминол (5·10⁻⁵ моль/л) и выявляли параметры усиленной люминолом (Люм-) хемилюминесценции. В этом случае хемилюминесценция обусловлена генерацией нейтрофилами АКМ при активации клеток в процессе адгезии к стеклу. Затем в исследуемые образцы вносили хемотаксический трипептид N-формилметионил-лейцил-фенилаланин (fMLP 7,5·10⁻⁷ моль/л), латекс (50 мкл разбавленной 1:50 базовой суспензии латекса из набора для определения ревматоидного фактора) и определяли параметры ХЛ, вызванной образованием АКМ при адгезии к стеклу, действии fMLP и фагоцитозе, вызванном латексом. Кинетические зависимости интенсивности ХЛ активированных различными способами клеток регистрировали с помощью компьютеризированного измерительного комплекса, включающего биохемилюминометр БХЛ-1 (БГУ, Беларусь) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom (Новые аналитические системы, Беларусь). Температура, при которой проводили исследования, составила 37°C. Интегральную интенсивность ХЛ клеток вычисляли как площадь под кинетической кривой, полученной за время измерения 10 мин при адгезии или за время 4 мин при действии fMLP или латекса. Ингибиторный эффект выражали в процентах [4; 5].

Гипотермию и гипертермию моделировали с использованием зерновок ячменя сорта «Гонар». Для этого 5-суточные проростки ячменя вносили на 24 часа в камеру с температурой 4–6°C, затем на сутки растения возвращали в исходные температурные условия либо 6-суточные проростки вносили в термостат и выдерживали на 3 часа при 40°C, затем на сутки растения возвращали в оптимальные температурные условия. Анализы проводили на 7-суточных проростках ячменя.

Содержание продуктов перекисного окисления липидов выявляли в вегетативной массе растений с использованием теста с 2-тиобарбитуровой кислотой. Концентрацию ТБКРС рассчитывали посредством молярного коэффициента экстинкции 1,56·10⁵ моль⁻¹·см⁻¹ и выражали в мкмоль/г. Активность каталазы устанавливали по методу Короляка, основанному на определении количества H₂O₂, не разложившегося после инкубации с каталазой, путем спектрофотометрической регистрации окрашенного продукта реакции взаимодействия пероксида водорода с молибдатом аммония и рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции – 22200 см⁻¹·M⁻¹ (мкмоль/мин·г ткани). Активность глутатион-редуктазы детектировали на основе метода, который заключается в превращении GSSG в GSH в присутствии НАДФН, и рассчитывали с учетом коэффициента молярной экстинкции 6,22 ММ⁻¹·см⁻¹ (мкмоль/мин·г ткани). Активность супероксиддисмутазы устанавливали с использованием системы,

обеспечивающей восстановление нитросинего тетразолия (НСТ), и рассчитывали с учетом процента ингибирования реакции (ммоль/мин·г ткани) [6].

Результаты и их обсуждение. В ходе исследований вначале определили содержание биологически активных веществ в вегетативной массе растений одуванчика и клевера из трех районов Витебской области в разные периоды вегетации. Установлено, что самое высокое содержание суммы фенольных соединений и гликозидов зафиксировано в листьях одуванчика лекарственного (*T. officinale*), собранного в Браславском районе, в период его цветения и плодоношения, а дубильных соединений — в листьях, заготовленных в Витебском районе. Показано, что содержание фенольных соединений в вегетативной массе в период цветения выше, чем в период плодоношения, в Браславском и Глубокском районах. Самое высокое содержание суммы фенольных соединений зафиксировано в листьях клевера лугового (*T. pratense*) из Браславского района в период плодоношения. Содержание фенольных соединений в вегетативной массе клевера в период плодоношения выше, как и у одуванчика. Флавоноидные соединения в исследуемом растительном материале представлены авилякурином, кверцетином, кемпферолом, лютеолином, морином, апигенином; содержат изокверцетин, гиперозид, гомориентин, рутин, изосалипурнозид. Установили, что самая высокая концентрация из вышеперечисленных флавоноидов в листьях одуванчика принадлежит авилякурину, апигенину и рутину в период цветения; авилякурину и рутину в период плодоношения. Содержание флавоноидов в листьях клевера Витебского района самое высокое в период цветения и плодоношения. Концентрация в листьях клевера авилякурина выше в период цветения; авилякурина и кемпферола в период плодоношения. Таким образом доказали, что на фитохимический состав растений влияют место сбора и вегетативный период. Исследования в этом направлении будут продолжены с другими дикорастущими растениями.

Проведена оценка степени выраженности антиоксидантного действия растительных экстрактов на основе биохимических исследований 25 растений, произрастающих в Белорусском Поозерье. Ниже приводятся содержащиеся вещества в исследованных растениях, которые могут определять их антиоксидантное действие: зверобой продырявленный, трава — *Hypericum perforatum* (антрахиноны, флавоноиды, проантоцианидины); лабазник вязолистный, цветки — *Filipendula ulmaria* (флавоноиды); рута душистая, трава — *Ruta graveolens* (алкалоиды, флавоноиды); донник лекарственный, трава — *Melilotus officinalis* (кумарины, флавоноиды); пустырник сердечный, трава — *Leonurus cardiac* (флавоноиды, иридоиды); эхинацея пурпурная, трава — *Echinacea purpurea* (коричные кислоты); пижма бальзамическая (кануфер), трава — *Tanacetum balsamita* (эфирное масло, флавоноиды); череда трехраздельная, трава — *Biden tripartita* (флавоноиды, полиацетилены); бруслика обыкновенная, листья — *Vaccinium vitis-idaea* (фенолгликозиды, флавоноиды, танины); береза пушистая, листья — *Betula pubescens* (флавоноиды, танины); чистотел большой, трава — *Chelidonium majus* (алкалоиды, флавоноиды); каштан, семена — *Aesculus hippocastanum* (сапонины); буквица лекарственная, трава — *Betonica officiosa* (флавоноиды, иридоиды); кукуруза, рыльца — *Zea mays* (флавоноиды); крапива двудомная, листья — *Urtica dioica* (коричные кислоты, флавоноиды); маклеляя сердцевидная, листья — *Macleaya cordata* (алкалоиды, флавоноиды); малина обыкновенная, листья — *Rubus idaeus* (флавоноиды, танины); репешок аптечный, трава — *Agrimonia eupatoria* (флавоноиды, танины); хвощ полевой, трава — *Equisetum arvense* (флавоноиды); лещина обыкновенная, листья — *Corylus avellana* (флавоноиды, танины); фиалка трехцветная, трава — *Viola tricolor* (флавоноиды, эфирное масло); сабельник болотный, корневища — *Comarum palustre* (проантоцианидины, флавоноиды); каштан, цветки — *Aesculus hippocastanum* (флавоноиды, кумарины); полынь божье дерево, трава — *Artemisia abrotanum* (флавоноиды, эфирные масла); левзея сафлоровидная, листья — *Leuzea carthamoides* (экдистероиды, флавоноиды) [7].

Предварительную оценку антиоксидантных свойств экстрактов растений на генерацию активных кислородных метаболитов в нейтрофилах выполнили на бесклеточных системах, содержащих пероксидазы и их субстраты. Для этого использовали бесклеточную систему, содержащую пероксидазу хрена, H_2O_2 и люминол. В этом случае окисление люминола сопровождается возникновением люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). Доказано, что добавление экстрактов лекарственных растений снижает интенсивность хемилюминесценции. Для определения способности экстрактов подавлять реакцию пероксидазного окисления изучили зависимость от вносимых концентраций и определили концентрации экстрактов, при которых наблюдается 50% ингибирование люминолзависимой

хемилюминесценции (C_{50}). После определения действующих концентраций экстракты растений добавляли к нейтрофилам и вносили факторы, вызывающие генерацию активных кислородных метаболитов и описанные в материалах и методах исследований.

Установлено, что концентрации экстрактов растений, необходимые для ингибиования генерации АКМ нейтрофилами, гораздо выше, чем концентрации, необходимые для ингибиования пероксидазного окисления в модельной бесклеточной среде. Объяснить это можно наличием мембран, препятствующих проникновению компонентов экстрактов внутрь клеток.

Выявлено, что наибольшим антиоксидантным действием, а следовательно, способностью ингибиовать активность пероксидаз и подавлять активность нейтрофилов при адгезии, действии хемоатрактантного и при индуцировании фагоцитоза обладают водные экстракты зверобоя, лабазника и руты. При этом высокой корреляции между химической природой основной группы действующих веществ и антиоксидантной активностью растений не выявлено [7].

В равновесии с представителями растительной биоты находятся насекомые и, прежде всего, пчелы. Для современной биотехнологии особый интерес представляет трутневый расплод пчел. Развитие трутней происходит из неоплодотворенных яиц. Из яиц выходят личинки и развиваются с полным метаморфозом. Процесс постэмбрионального развития регулируется гормонами, личиночная стадия длится примерно 7 суток. Методом жидкостной хроматографии с масс-спектральным детектором в расплоде пчел идентифицирована 31 аминокислота, в том числе все незаменимые для человека. Суммарное содержание аминокислот в пчелином расплоде составляет от 37,6 до 40,6%, что может свидетельствовать о его высокой питательной ценности и антиоксидантной активности [8; 9]. Нами исследована супензия гомогената расплода пчел (ГРП). Установлено, что в его присутствии интенсивность окисления люминола, катализируемого пероксидазой хрена, снижается по сравнению с контролем.

Изучено влияние ГРП на процессы образования нейтрофилами активных кислородных метаболитов, анализируемые по интенсивности ЛЗХЛ нейтрофилов при их активации. Установлено, что в присутствии гомогената расплода пчел происходит достоверное снижение генерации АКМ нейтрофилами при всех использованных видах стимуляции. С увеличением концентрации ГРП степень ингибиования активности нейтрофилов прямо пропорционально возрастает. Эффективность действия гомогената расплода пчел в отношении свободной пероксидазы на несколько порядков выше, чем эффективность ингибиования активности нейтрофилов, как и в случае с экстрактами растений. Значительный ингибирующий эффект в отношении клеток проявляется при концентрациях препарата от 1 мкг/мл и выше.

В условиях поддержания китайского дубового шелкопряда в культуре (в лаборатории в осенне-зимний период и выкормки в инсектарии в весенне-летний период) стадия куколки продолжается 7–8 месяцев. За это время проходит полный гистолиз основных тканей личинок 5 возраста и формирование тканей имаго. Процессы гистолиза у шелкопряда могут помочь проанализировать гипотезу, согласно которой живые организмы, испытывающие окислительный стресс, начинают спад белков, нуклеиновых кислот, гемопротеинов, что ведет к освобождению низкомолекулярных веществ (аминокислот, мочевой кислоты, билирубина), обладающих антиоксидантным действием. Для подтверждения этого предположения использовали определение антиоксидантной активности в динамике гистолиза гусениц V возраста, ведущего к образованию жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда. Позже провели сравнительный анализ антиоксидантной активности гемолимфы куколок с аналогичной активностью гемолимфы виноградных улиток, расплода пчел и лекарственных растений.

В результате гистолиза тканей гусеницы в жидким содержимом куколок формируется уникальный антиоксидантный комплекс [9; 10], включающий 1) антиоксидантные аминокислоты; 2) антиоксидантные витамины (аскорбиновая кислота — $181,5 \pm 27,0$ мкг/мл, токоферолы — $12,5 \pm 0,88$ мкг/мл, ретинол — $0,037 \pm 0,013$ мкг/мл); 3) мочевую кислоту — $303 \pm 62,3$ мкмоль/л, 4) SH-группы — 41,9 мкмоль/л, включая восстановленный глутатион — 23,5 мкмоль/л и глутатионпероксидазу — $42 \pm 9,0$ нмоль GSH/мин \times мг белка. Этот комплекс способен обеспечить подавление разрушающего влияния окислительного стресса на макромолекулы — белки и нуклеиновые кислоты [10]. Сравнили ингибирующий эффект гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда и гусениц V возраста на генерацию гидроксильного радикала в присутствии $FeSO_4$ (50 мкмоль/л) и H_2O_2 (50 мкмоль/л) в бесклеточной системе. Установлено, что оба образца гемолимфы ингибировали реакцию, при этом гемолимфа куколок

в 10 раз была сильнее по сравнению с гемолимфой гусениц. Выявлено, что 50% ингибиование люминолзависимой хемилюминесценции наблюдалось при разбавлении содержимого гусениц в 550 раз, а содержимого куколок — примерно в 5000 раз.

Так как выход НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы из нейтрофилов и их инактивация могут происходить в результате клеточной гибели, было установлено повреждение нейтрофилов при действии гемолимфы по высвобождению фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Последняя является цитозольным ферментом и обнаруживается во внеклеточной среде только при нарушении мембран клеток. Проведенные исследования доказали, что гемолимфа гусениц и куколок в изученных разведениях не приводит к выбросу из нейтрофилов ЛДГ, а значит, не вызывает разрушение нейтрофилов.

Для подтверждения установленного эффективного антиоксидантного действия гемолимфы куколок китайского дубового шелкопряда провели сравнение с антиоксидантным действием гемолимфы виноградных улиток. Данные эксперименты показали, что ингибиование ЛЗХЛ в присутствии гемолимфы куколок шелкопряда происходит при больших разведениях (по сравнению с гемолимфой виноградных улиток). Сравнительные расчеты продемонстрировали, что добавление в среду гемолимфы куколок дубового шелкопряда эффективнее гемолимфы виноградных улиток в системе люминол + гипохлорит водорода в 200 раз, люминол + пероксидаза хрена + пероксид водорода в 200 раз, люминол + миелопероксидаза + пероксид водорода в 500 раз, генерации АКМ нейтрофилами при адгезии к стеклу в 700 раз, генерации АКМ нейтрофилами при действии хемотаксического трипептида fMLP в 300 раз и генерации АКМ нейтрофилами при действии латекса в 4000 раз. Это доказывает перспективность культивирования виноградных улиток и китайского дубового шелкопряда в условиях Белорусского Поозерья.

Приведенные исследования выявляют существенно более мощные антиоксидантные свойства гемолимфы куколок дубового шелкопряда по сравнению с гемолимфой гусениц V возраста и гемолимфой виноградных улиток. На наш взгляд, это связано с увеличением концентрации продуктов распада нуклеиновых кислот (мочевой кислоты) и белков (антиоксидантных аминокислот) в процессе гистолиза.

Следующим этапом было сравнение антиоксидантной активности продуктов гистолиза (гемолимфы куколок) и гомогената расплода пчел. Путем установления ингибиции лиминолзависимой хемилюминесценции в бесклеточных системах и с участием активированных нейтрофилов показали, что гомогенат расплода пчел уступает по антиоксидантной активности гемолимфе куколок дубового шелкопряда в 100–1000 раз.

На основании доказанных антиоксидантных эффектов гемолимфы куколок шелкопряда из содержимого куколок в соответствии с патентом Республики Беларусь «Способ получения средства для профилактики инсулинерезистентности» № 15645 (А.А. Чиркин [и др.]) был получен водный экстракт куколок китайского дубового шелкопряда (далее Экстракт). Проверка эффектов полученного Экстракта проводилась на растительных объектах (ячмень (*Hordeum vulgare*) и лук репчатый (*Allium sera*)).

Окислительный стресс у ячменя вызывали действием повышенных (гипертермия) и пониженных (гипотермия) температур. Установили, что температурный стресс приводит к увеличению ТБК-реагирующих соединений в проростках ячменя на 56–68% по сравнению с контролем. Активность антиоксидантных ферментов каталазы и глутатионредуктазы у растений при гипо- и гипертермии также возросла на 49–58%. Предварительная обработка зерновок ячменя Экстрактом защищала растения от проявлений окислительного стресса. Так, содержание ТБК-реагирующих соединений снижалось на 43–50% по сравнению с зерновками без предварительной обработки. К тому же обработка Экстрактом привела к снижению антиоксидантных ферментов на 40%.

Окислительный стресс, вызванный действием солей тяжелых металлов (меди и свинца), моделировали у лука репчатого путем помещения корней проросших луковиц в растворы соответствующих солей. Выявили, что обработка проросших луковиц *A. sera* солями $CuSO_4$ и $Pb(NO_3)_2$ приводит к видимым морфологическим проявлениям (угнетение роста корней) признаков окислительного стресса через 9 суток. В выросших листьях лука при моделировании стресса зафиксировали достоверное повышение ТБК-реагирующих соединений и активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы по сравнению с контрольной группой. Обработка луковиц солями меди и свинца совместно с Экстрактом частично препятствует накоплению продуктов перекисного окисления липидов и нормализует развитие корней.

Антиоксидантный эффект Экстракта доказывается и сохранением антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутаза, глутатионредуктаза) листьев лука на уровне контрольных значений.

Заключение. У представителей растительного и животного мира Белорусского Поозерья выраженность антиоксидантной активности распределена в последовательности: гемолимфа куколок китайского дубового шелкопряда > гемолимфа гусениц шелкопряда V возраста > гемолимфа виноградных улиток > гомогенат расплода пчел > экстракты лекарственных растений. Биоресурсы Белорусского Поозерья, включая культивируемые искусственно виды, обладают перспективным потенциалом для производства антиоксидантных препаратов на их основе.

ЛИТЕРАТУРА

- Гинс, М.С. К вопросу об антиоксидантном метаболоме овощных культур селекции ВНИИССОК / М.С. Гинс, В.К. Гинс // Овощи России. — 2015. — № 2. — С. 75–79. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2015-2-75-79>.
- More, G.K. Metabolomic Profiling of Antioxidant Compounds in Five *Vachellia* Species / G.K. More, S. Meddows-Taylor, G. Prinsloo // Molecules. — 2021. — Vol. 26, № 20. — DOI: 10.3390/molecules26206214.
- Munteanu, I.G. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review / I.G. Munteanu, C. Apetrei // International Journal of Molecular Sciences. — 2021. — Vol. 22, № 7. — DOI: 10.3390/ijms22073380.
- Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase *in vitro* / A.I. Kavalenka [et al.] // Cell and Tissue Biology. — 2007. — Vol. 1, № 6. — P. 551–559.
- Коваленко, Е.И. Хемилюминесцентный метод в открытии антиоксидантной активности куколок дубового шелкопряда / Е.И. Коваленко, А.А. Чиркин // Современные проблемы биохимии / под ред. А.П. Солодкова и А.А. Чиркина. — Витебск: УО «ВГУ им. П.М. Машерова», 2010. — С. 58–80.
- Толкачёва, Т.А. Защитные реакции растительных объектов при стрессе и методы их оценки / Т.А. Толкачёва, И.М. Морозова, Г.В. Ляхнович // Современные проблемы биохимии. Методы исследований / под ред. проф. А.А. Чиркина. — Минск: Вышэйшая школа, 2013. — С. 438–469.
- Чиркин, А.А. Антиоксидантная активность водных экстрактов лекарственных растений / А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, Г.Н. Бузук, Т.А. Толкачёва // Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта. — 2012. — № 1(67). — С. 47–53.
- Comparative study on quality parameters of royal jelly, apilarnil and queen bee larvae triturate / R. Margaoan [et al.] // Animal Science & Biotechnologies. — 2017. — Vol. 74, № 1. — P. 51–58.
- Чиркин, А.А. Биологическая активность продуктов гистолиза: теория и практика / А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, Т.А. Толкачёва. — Saarbruecken: Lambert Academic Publishing, 2012. — 156 с.
- Толкачёва, Т.А. Гистолиз: теория и практика / Т.А. Толкачёва. — Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2015. — 136 с.

РЕФЕРЕНЦЕС

- Gins M.S., Gins V.K. *Ovoshchi Rossii* [Vegetables of Russia], 2015, 2, pp. 75–79. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2015-2-75-79>.
- More, G.K. Metabolomic Profiling of Antioxidant Compounds in Five *Vachellia* Species / G.K. More, S. Meddows-Taylor, G. Prinsloo // Molecules. — 2021. — Vol. 26, № 20. — DOI: 10.3390/molecules26206214.
- Munteanu, I.G. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review / I.G. Munteanu, C. Apetrei // International Journal of Molecular Sciences. — 2021. — Vol. 22, № 7. — DOI: 10.3390/ijms22073380.
- Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase *in vitro* / A.I. Kavalenka [et al.] // Cell and Tissue Biology. — 2007. — Vol. 1, № 6. — P. 551–559.
- Kovalenko E.I., Chirkin A.A. *Sovremenniye problemy biokhimii* [Modern Issues of Biochemistry], Vitebsk: UO “VGU im. P.M. Masherova”, 2010, pp. 58–80.
- Tolkacheva T.A., Morozova I.M., Liakhovich G.V. *Sovremenniye problemy biokhimii. Metody issledovani* [Modern Issues of Biochemistry. Research Methods], Minsk: Vysheishaya shkola, 2013, pp. 438–469.
- Chirkin A.A., Kovalenko E.I., Buzuk G.N., Tolkacheva T.A. *Vesnik Vitsebskaga dziarzhaunaga universiteta* [Journal of Vitebsk State University], 2012, 1(67), pp. 47–53.
- Comparative study on quality parameters of royal jelly, apilarnil and queen bee larvae triturate / R. Margaoan [et al.] // Animal Science & Biotechnologies. — 2017. — Vol. 74, № 1. — P. 51–58.
- Chirkin A.A., Kovalenko E.I., Tolkacheva T.A. *Biologicheskaya aktivnost produktov gistoliza: teoriya i praktika* [Biological Activity of Histolysis Products: Theory and Practice], Saarbruecken: Lambert Academic Publishing, 2012. — 156 p.
- Tolkacheva T.A. *Gistoliz: teoriya i praktika* [Histolysis: Theory and Practice], Vitebsk: VGU imeni P.M. Masherova, 2015, 136 p.

Поступила в редакцию 03.10.2025

Адрес для корреспонденции: e-mail: tanyatolkacheva@mail.ru — Толкачева Т.А.